



EXPRESS MAIL CERTIFICATE

Date 3/4/02 Label No. EV 03913908018

I hereby certify that, on the date indicated above, this paper or fee was deposited with the U.S. Postal Service & that it was addressed for delivery to the Assistant Commissioner for Patents, Washington, DC 20231 by "Express Mail Post Office to Addressee" service.

A. DiLullo
Name (Print) Signature

03 - 06 - 02

RECEIVED

MAR 15 2002

TECH CENTER 1600/2900

PLEASE CHARGE ANY DEFICIENCY UP TO \$300.00 OR CREDIT ANY EXCESS IN THE FEES DUE WITH THIS DOCUMENT TO OUR DEPOSIT ACCOUNT NO. 04-0100

Customer No.:



07278

PATENT TRADEMARK OFFICE

Docket No.: 2136/OK111

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of: Pere RISTOL DEBART; Francisco RABANEDA GIMENEZ;
Ma Teresa LOPEZ HERNANDEZ

Serial No.: 10/052,324

Art Unit:

Confirmation No.:

Filed: 17 January 2002

Examiner:

For: PROCESS FOR THE PRODUCTION OF VIRUS-INACTIVATED HUMAN
GAMMAGLOBULIN G

CLAIM FOR PRIORITY

Hon. Commissioner of
Patents and Trademarks
Washington, DC 20231

Sir:

Applicant hereby claims priority under 35 U.S.C. Section 119 based on
Spain application No. 200100101 filed 17 January 2001.

A certified copy of the priority document is submitted herewith.

Respectfully submitted,

Dated: March 4, 2002

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Paul Fields", is written over a horizontal line.

Paul Fields

Reg. No. 20,298

Attorney for Applicant(s)

DARBY & DARBY P.C.
805 Third Avenue
New York, New York 10022
212-527-7700





RECEIVED

MAR 15 2002

TECH CENTER 1600/2900

RECEIVED

MAR 15 2002

TECH CENTER 1600/2900

SPANISH PATENT

AND

TRADE MARK OFFICE

OFFICIAL CERTIFICATE

I hereby certify that the attached documents are a truly copy of Spanish PATENT OF INVENTION Application number 200100101, filed before this Office on 17th January 2001.

Madrid, 15th January 2002

The Director of the Department
of Patents and Technological
Information

Seal

Signature

M. MADRUGA



RECEIVED

MAR 15 2002

TECH CENTER 1600/2900

OFICINA ESPAÑOLA

de

PATENTES y MARCAS

CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 200100101, que tiene fecha de presentación en este Organismo el 17 de Enero de 2001.

Madrid, 15 de enero de 2002

El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica.

P.D.

M MADRUGA



SPANISH PATENT AND TRADE MARK OFFICE

RECEIVED

APPLICATION NUMBER
P 200100101DATE AND TIME OF FILING
AT THE SPANISH PATENT AND
TRADE MARK OFFICE

01 17th JAN. 10:57

DATE AND TIME OF FILING ELSEWHERE

APPLICATION FORM:
X PATENT OF INVENTION UTILITY MODEL

MAR 15 2002

TECH CENTER 1600/2900

(1) ADDITIONAL APPLICATION
DIVISIONAL APPLICATION
CHANGE OF MODALITY
EUROPEAN APPLICATION
TRANSFORMATION

(2) MAIN OR ORIGINAL FILE
MODALITY
APPLICATION NUMBER
APPLICATION DATE
MODALITY
APPLICATION NUMBER
APPLICATION DATE

(3) FILING PLACE CODE
MADRID 28(4) APPLICANT(S) SURNAMES OR SOCIAL DENOMINATION
GRUPO GRIFOLS, S.A.

NAME

DNI

A-58389123

(5) DATA OF THE MAIN APPLICANT (Seal)

ADDRESS: Polígono LEVANTE - Can Guasch, 2

CITY: PARETS DEL VALLES

PROVINCE: BARCELONA

COUNTRY OF RESIDENCE: Spain

NATIONALITY: Spanish

TELEPHONE

POSTAL CODE: 08150

COUNTRY CODE: ES

NATION CODE: ES

(6) INVENTOR(S) (7) The Applicant is the inventor (8) WAY OF ACQUIREMENT OF THE RIGHT
XThe Applicant is not the inventor XLabour relationship
or the only inventor Agreement Succession

SURNAMES

NAME

NATIONALITY

NATION CODE

RISTOL DEBART

PERE

Spanish

ES

RABANEDA GIMÉNEZ

FRANCISCO

Spanish

ES

LÓPEZ HERNÁNDEZ

M^a TERESA

Spanish

ES

(9) TITLE OF THE INVENTION

"Process for the production of virus-inactivated human gammaglobulin G"

(10) INVENTION CONCERNING MICROBIOLOGICAL PROCESS, ART.25.2 L.P. YES x NO

(11) OFFICIAL EXHIBITIONS

PLACE

DATE

(12) PRIORITY DECLARATIONS

COUNTRY OF ORIGIN

COUNTRY CODE

NUMBER

DATE

(13) THE APPLICANT REQUESTS EXEMPTION OF TAXES AS PER ART.162 L.P. YES x NO

(14) REPRESENTATIVE SURNAMES

NAME

CODE

DURAN MOYA

LUIS-ALFONSO

415(4)

ADDRESS

CITY:

PROVINCE:

POSTAL CODE:

Paseo de Gracia, 101 - pral.

BARCELONA

BARCELONA

08008

(15) ENCLOSED DOCUMENTS:

OFFICER'S SIGNATURE

x Specification. No. of pages: 55

x Representation document

x Claims. N° of pages: 6

Prints

(signature)

Drawings: N° of pages:

x Tax receipt

x Abstract

Complementary Information sheet

Priority document

x Other Diskette containing

APPLICANT'S OR
REPRESENTATIVE'S
SIGNATURE

Translation of priority document

specification and claims (*)

(16) NOTIFICATION OF PAYMENT OF GRANTING TAX

You are communicated that this application will be considered as
withdrawn if the payment of the tax for grant is not carried out;
for the payment of this tax there will be a term of three months
from the publication of the grant in the gazette and additionally
10 more days according to art. 81 of Royal Decree 10-10-86.

(*) in magnetic data carrier.

(signature)



RECEIVED

MAR 15 2002

TECH CENTER 1600/2900

ABSTRACT AND GRAPHIC FEATURE

RECEIVED

MAR 15 2002

TECH CENTER 1600/2900

APPLICATION NUMBER

P 200100101

DATE AND TIME OF FILING

01 17th JANUARY 10:57

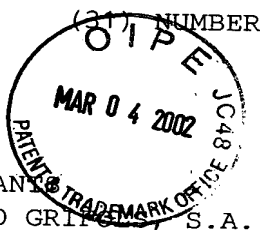
ABSTRACT (Max. 150 words)

Process for the production of virus-inactivated human gammaglobulin G.

The gammaglobulin is extracted from a fraction isolated by fractionation with ethanol in the presence of a carbohydrate, and after reducing the content of contaminants with PEG, it is applied to an anionic resin exchange column, an effluent being obtained in which the PEG content is subsequently reduced by ultrafiltration and which is concentrated in order to carry out sequentially an optional treatment at an acid pH and at least one of the following steps of viral inactivation, consisting of pasteurisation and a treatment with solvent/detergent, the product afterwards being precipitated and washed with PEG in order to eliminate any chemical viral inactivation reagents and then, by solubilisation and change of pH, the protein contaminants, and finally purified by ultrafiltration to reduce the volume and the PEG content, then carrying out an optional virus filtration and subsequent concentration to a protein value of 5% or 10%.

GRAPHIC FEATURE

SPANISH PATENT
AND
TRADE MARK
OFFICE



PRIORITY DATA
(31) NUMBER (32) DATE (33) COUNTRY

A1 (12) PATENT OF INVENTION
(21) APPLICATION NUMBER
P 200100101
(22) DATE OF FILING
17th JAN. 2001

(71) APPLICANT'S NAME
GRUPO GRIFOLS, S.A.

RECEIVED
MAR 15 2002
TECH CENTER 1600/2900

NATIONALITY
Spanish

ADDRESS 08150 PARETS DEL VALLES (Barcelona) - Polígono LEVANTE -
Can Guasch, 2

(72) INVENTOR(S)

Mr. Pere RISTOL Debart, Mr. Francisco RABANEDA Giménez and Ms. M^a Teresa
LOPEZ Hernández

(73) OWNER(S)

(11) PUBLICATION NUMBER (45) PUBLICATION DATE (62) PATENT OF WHICH GRAPHIC FEATURE
IT IS DIVISIONAL (ONLY TO MAKE INTERPRETATION
(51) INT. CLASS. OF ABSTRACT)

(54) TITLE

"Process for the production of virus-inactivated human gammaglobulin G"

(57) ABSTRACT (VOLUNTARY FILING WITHOUT ANY JURIDICAL VALUE)

Process for the production of virus-inactivated human gammaglobulin G.

The gammaglobulin is extracted from a fraction isolated by fractionation with ethanol in the presence of a carbohydrate, and after reducing the content of contaminants with PEG, it is applied to an anionic resin exchange column, an effluent being obtained in which the PEG content is subsequently reduced by ultrafiltration and which is concentrated in order to carry out sequentially an optional treatment at an acid pH and at least one of the following steps of viral inactivation, consisting of pasteurisation and a treatment with solvent/detergent, the product afterwards being precipitated and washed with PEG in order to eliminate any chemical viral inactivation reagents and then, by solubilisation and change of pH, the protein contaminants, and finally purified by ultrafiltration to reduce the volume and the PEG content, then carrying out an optional virus filtration and subsequent concentration to a protein value of 5% or 10%.

CERTIFICATION

Mr. Luis-Alfonso Durán Moya Sworn Translator in the English language,
certifies that the foregoing is a true and complete translation into English
of the document attached hereto, written in Spanish language.

Barcelona, 22nd January 2002



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y
MARCAS

INSTANCIA DE SOLICITUD DE:

☒ PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO

(1)	(2) EXPED. PRIOR.
<input type="checkbox"/> SOLICITUD DE ADICION	MODALIDAD
<input type="checkbox"/> SOLICITUD DIVISIONAL	NUMERO SOLIC.
<input type="checkbox"/> CAMBIO DE MODALIDAD	FECHA SOLICIT.
<input type="checkbox"/> TRANSFORMACION SOLICITUD EUROPEA	MODALIDAD
	NUMERO SOLIC.
	FECHA SOLICIT.



NUMERO DE SOLICITUD
P200100101

FECHA Y HORA DE PRESENTACION EN O.E.P.M.
01 ENE 17 10:57

FECHA Y HORA DE PRESENTACION EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(3) LUGAR DE PRESENTACION CODIGO
MADRID 28

(4) SOLICITANTES(S)	APELLIDOS O DENOMINACION JURIDICA	NOMBRE	DNI
GRUPO GRIFOLS, S.A.			A-58389123

(5) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE

DOMICILIO Polígono LEVANTE - Can Guasch, 2 Panamá, 1 - Madrid 28071
LOCALIDAD PARETS DEL VALLES
PROVINCIA BARCELONA
PAIS RESIDENCIA ESPAÑA
NACIONALIDAD española
TELEFONO
CODIGO POSTAL 08150
CODIGO PAIS ES
CODIGO NACION ES

(6) INVENTORES	(7) <input type="checkbox"/> EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR <input checked="" type="checkbox"/> EL SOLICITANTE NO EL INVENTOR O UNICO INVENTOR	(8) MODO DE OBTENCION DEL DERECHO <input checked="" type="checkbox"/> INVEN. LABORAL <input type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESION	
APELLIDOS	NOMBRE	NACIONALIDAD	COD. NACION
RISTOL DEBART	PERE	española	ES
RABANEDA GIMÉNEZ	FRANCISCO	española	ES
LÓPEZ HERNÁNDEZ	Mª TERESA	española	ES

(9) TITULO DE LA INVENCION

"PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE GAMMAGLOBULINA G HUMANA INACTIVADA DE VIRUS"

(10) INVENCION REFERENTE A PROCEDIMIENTO MICROBIOLOGICO SEGUN ART. 25.2 L.P. ☐ SI ☒ NO

(11) EXPOSICIONES OFICIALES

LUGAR FECHA

(12) DECLARACIONES DE PRIORIDAD

PAIS DE ORIGEN	COD. PAIS	NUMERO	FECHA

(13) EL SOLICITANTE SE ACOGE A LA EXENCION DE PAGO DE TASAS PREVISTA EN EL ART. 162 L.P. ☐ SI ☒ NO

(14) REPRESENTANTE	APELLIDOS	NOMBRE	CODIGO
	DURÁN MOYA (COL.265)	LUIS-ALFONSO	415/4
DOMICILIO	LOCALIDAD	PROVINCIA	COD.POSTAL
Paseo de Gracia, 101 Pral.	BARCELONA	BARCELONA	08008

(15) RELACION DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN

<input checked="" type="checkbox"/> DESCRIPCION. Nº DE PAGINAS..... 55	<input checked="" type="checkbox"/> DOCUMENTO DE REPRESENTACION
<input checked="" type="checkbox"/> REIVINDICACIONES. Nº DE PAGINAS..6	<input type="checkbox"/> PRUEBAS
<input type="checkbox"/> DIBUJOS. Nº DE PAGINAS.....	<input checked="" type="checkbox"/> JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASAS
<input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN	<input type="checkbox"/> HOJA DE INFORMACIONES COMPLEMENTARIAS
<input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE PRIORIDAD	<input checked="" type="checkbox"/> OTROS DCL. ADQUI. DERECHOS INV.
<input type="checkbox"/> TRADUCCION DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD	

FIRMA DEL FUNCIONARIO

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

(16) NOTIFICACION DE PAGO DE LA TASA DE CONCESION

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 10-10-86.

ILMO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

UNE A-4 MOD. 31011

memoria, reivindicaciones, y resumen en soporte magnético.

ESPAÑOLA DE PATENTES

OFICINA



Y MARCAS

DATOS DE PRIORIDAD

(31) NÚMERO

(32) FECHA

(33) PAÍS

A1

(12) PATENTE DE INVENCION

(21) NÚMERO DE SOLICITUD

P200100101

(22) FECHA DE PRESENTACION

17 ENE. 2001

(71) SOLICITANTE(S)

GRUPO GRIFOLS, S.A.

NACIONALIDAD
españolaDOMICILIO 08150 PARETS DEL VALLES (Barcelona) - Polígono LEVANTE - Can
Guasch, 2

(72) INVENTOR(ES)

D. Pere RISTOL Debart, D. Francisco RABANEDA Giménez y D^a M^a Teresa
LÓPEZ Hernández.

(73) TITULAR(ES)

(11) N° DE PUBLICACION

(46) FECHA DE PUBLICACION

(62) PATENTE DE LA QUE ES
DIVISIONARIA

GRAFICO (SLOPPA INIETTERE D'ESUMEN)

(51) Int. Cl.

(54) TITULO

"PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE
GAMMAGLOBULINA G HUMANA INACTIVADA
DE VIRUS"

(57) RESUMEN

Procedimiento para la producción de gammaglobulina G humana inactivada de virus.

Se efectúa la extracción de la gammaglobulina de una fracción aislada por fraccionamiento con etanol en presencia de un carbohidrato, y después de reducir el contenido de contaminantes con PEG, se aplica a una columna de resinas de intercambio aniónico obteniéndose un efluente cuyo contenido de PEG es posteriormente reducido por ultrafiltración y se concentra para llevar a cabo de forma secuencial un eventual tratamiento a pH ácido y al menos una de las siguientes etapas de inactivación vírica, consistentes en una pasteurización y un tratamiento con solvente-detergente, siendo después el producto precipitado y lavado con PEG para eliminar los eventuales reactivos químicos de inactivación vírica y luego, por solubilización y cambio de pH, los contaminantes proteicos, y finalmente purificado por ultrafiltración para reducir el volumen y el contenido de PEG, efectuando luego una eventual filtración de virus y posterior concentración hasta el valor de proteína del 5% ó 10%.

P200100101



PATENTE

RESUMEN Y GRAFICO

NUMERO DE SOLICITUD

01 ENE 17 10 57

FECHA DE PRESENTACION

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

Procedimiento para la producción de gammaglobulina G humana inactivada de virus.

Se efectúa la extracción de la gammaglobulina de una fracción aislada por fraccionamiento con etanol en presencia de un carbohidrato, y después de reducir el contenido de contaminantes con PEG, se aplica a una columna de resinas de intercambio aniónico obteniéndose un efluente cuyo contenido de PEG es posteriormente reducido por ultrafiltración y se concentra para llevar a cabo de forma secuencial un eventual tratamiento a pH ácido y al menos una de las siguientes etapas de inactivación vírica, consistentes en una pasteurización y un tratamiento con solvente-detergente, siendo después el producto precipitado y lavado con PEG para eliminar los eventuales reactivos químicos de inactivación vírica y luego, por solubilización y cambio de pH, los contaminantes proteicos, y finalmente purificado por ultrafiltración para reducir el volumen y el contenido de PEG, efectuando luego una eventual filtración de virus y posterior concentración hasta el valor de proteína del 5% ó 10%.

GRAFICO

PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE
GAMMAGLOBULINA G HUMANA INACTIVADA DE VIRUS

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención se refiere a un
5 procedimiento para la producción de gammaglobulina G
humana inactivada de virus. El material de partida para la
obtención de la gammaglobulina (inmunoglobulina G humana
o IgG) de la invención procede de un pool de donaciones
(superior a 1000) de plasma humano formando una mezcla.....
10 polivalente de actividades anticuerpo, cuyas unidades.....
individuales han sido testadas frente a los marcadores
típicos de infecciosidad (virus VIH, hepatitis B, C).

La administración de la gammaglobulina puede
efectuarse por vía intramuscular, o más efectivamente por
15 vía intravenosa. Esta segunda vía presenta grandes
ventajas terapéuticas con respecto a la primera, como es
su mayor eficacia, pero puede acarrear reacciones adversas
graves. Sólo los productos obtenidos en unas condiciones
que no promuevan la desnaturalización y con un grado de
20 pureza adecuado, son aceptables por vía intravenosa.

La utilización clínica, preferente y más.....
efectiva del producto de la invención, es la vía.....
intravenosa, cuyas indicaciones terapéuticas son las
reconocidas para este tipo de productos (IgG) que
25 presentan unas características de composición y estructura
molecular similar. Las indicaciones terapéuticas más
comunes de la IgG de la invención se circunscriben en tres
grupos generales de patologías: inmunodeficiencias
primarias (déficit de la respuesta humoral),

inmunodeficiencias secundarias (o adquiridas, por ejemplo en la infección por virus), y las de origen autoinmune (desarrollo de autoanticuerpos). En cuanto al primer grupo, la IgG de la invención es potencialmente útil
5 frente a la inmunodeficiencia común variable, déficit de subclases de IgG, ausencia de IgA, y otros. Las enfermedades más comunes pertenecientes al segundo grupo figurarían las producidas como consecuencia de la infección por virus y bacterias (VIH o virus de la
10 inmunodeficiencia humana, citomegalovirus, herpes zoster, hepatitis B, ...), sepsis neonatal, etc. Las indicaciones identificadas de las IgG en enfermedades de componente autoinmune van cada día en aumento, destacando de entre ellas la púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) que
15 conlleva a la destrucción de las plaquetas, el síndrome de Kawasaki, etc.

En cuanto a los antecedentes previos, sobre preparación e infusión de gammaglobulina, éstos se remontan a finales de la década de los 40 a través de los
20 materiales producidos por el conocido método de fraccionamiento plasmático de Cohn (Cohn E.J., Strong L.E., et al. Separation into Fractions of the Protein and Lipoprotein Components. J. Am Chem. Soc. 68, 459-475; 1946), o más tardíamente con las modificaciones
25 introducidas por Kistler-Nitschmann (Kistler P. and Nitschmann Hs. Large Scale Production of Human Plasma Fractions. Vox Sang. 7: 414-424; 1962). La purificación adicional introducida por Oncley (Oncley J.L., et al. J. Am. Chem. Soc. 71: 541-550; 1949) a partir de un material
30 intermedio obtenido del fraccionamiento plasmático de Cohn dio lugar al conocido método de Cohn-Oncley, actualmente

aun vigente como método de purificación general de gammaglobulina, debido a que ambos utilizan etanol en frío como medio de concentración. La gammaglobulina producida por cualquiera de los anteriores métodos muestra una
5 distribución molecular con un contenido apreciable de formas polimerizadas o agregadas de alto peso molecular, al analizarse a través de una columna de exclusión en gel de alta resolución (HPLC). Asimismo, las presentaciones
10 líquidas así obtenidas pueden ofrecer poca estabilidad, observándose opalescencia o turbidez durante el almacenamiento, fragmentación y polimerización de las moléculas de gammaglobulina, tendencia a la reducción de la actividad de alguno de los anticuerpos más lábiles, generación espontánea de actividad anticomplementaria,
15 etc.

La problemática sobre la utilización terapéutica de gammaglobulina por infusión intravenosa se remonta a los primeros preparados obtenidos por el método de Cohn-Oncley, incluyendo sus múltiples variantes, que
20 provocaba la aparición de reacciones adversas (anafilactoides) con una incidencia muy elevada, especialmente en pacientes receptores agammaglobulinémicos (hasta en un 90% de los casos). Las reacciones descritas se asociaron a una disminución del complemento de los
25 pacientes tratados por esta vía (Barandun, S. et al. Vox Sang. 1962; 7: 157-174).

Se observó que la gammaglobulina obtenida por fraccionamiento alcohólico tiene una destacable capacidad para fijar el complemento de forma espontánea, como
30 resultado de la desnaturalización de la proteína producida durante el proceso de obtención, y especialmente, por la

generación de agregados de gammaglobulina que daban lugar a formas de alto peso molecular, los cuales actuarían, posiblemente, como complejos antígeno-anticuerpo con capacidad de fijar libremente el complemento.

5 La separación de los agregados de gammaglobulina por técnicas convencionales, sean las de ultracentrifugación o de cromatografía de exclusión (permeación en gel), permiten obtener un producto de baja actividad anticomplementaria tolerable por vía intravenosa
10 (Barandun et al., supra). Sin embargo, las técnicas de ultracentrifugación o permeación en gel no son escalables; a la producción industrial de un tamaño de lote del orden de algunos kg de gammaglobulina (y ni tan siquiera a la escala de gramos en el caso de la ultracentrifugación).

15 Por otro lado, la producción de gammaglobulina mediante fraccionamiento alcohólico, una vez liberada de los compuestos agregados de alto peso molecular, podría fácilmente recuperar su actividad anticomplemento en las operaciones finales de proceso (esterilización,
20 liofilización) o durante su almacenamiento (en líquido).

 Para evitar los graves inconvenientes que presentan la preparaciones clásicas obtenidas por el método de precipitación con etanol de Cohn-Oncley (o sus variantes), el estado actual del arte sustituye o
25 incorpora etapas adicionales que mejoran la estabilidad y la tolerancia del producto para su infusión intravenosa.

 Polson et al. (Polson, A. et al. Biochim. Biophys. Acta, 82: 463-475; 1964) describieron un proceso de fraccionamiento del plasma humano por medio de
30 polímeros del etilenglicol, mediante el cual se consigue separar una fracción purificada de gammaglobulina. Coval,

L. (Patentes US 4093606 y US 4165370, prioridad de 1976 y 1978 respectivamente) incorporan el polietilenglicol (PEG) como agente de purificación para la obtención de gammaglobulina intravenosa a partir de un material
5 separado del fraccionamiento de Cohn (fracción II o II+III). Con posterioridad se publican procesos de purificación equivalentes con polietilenglicol, como el descrito por Uemura Y., et al. (Patente española Nº 506679, solicitada en 1981), o bien similares con la única
10 diferencia en que se introduce la pasteurización opcional del material que contiene la gammaglobulina, de forma previa o posterior a la purificación con polietilenglicol, como revela también Uemura Y., et al. (Patente EP 0246579, prioridad de 1986). También se han relatado métodos
15 químicos de inactivación de virus con disolventes orgánicos y detergentes, muy eficientes frente a virus con cubierta lipídica, habiéndose aplicado a proteínas derivadas del plasma humano por Neurath et al. (Patente US: 514375).

20 Se han descrito procedimientos para la obtención de gammaglobulina aceptable para administración intravenosa utilizando un tratamiento con enzimas, pepsina (Patente española Nº 86115016 y Patente francesa 2382 M), plasmina (Patente alemana DE 2752694), tripsina
25 inmovilizada (Patente española P 0530592), o bien por tratamiento a pH ácido moderado (Acta Chemica Scandinavica, 22: 490-496; 1968) (Barandun S., et al., supra).

30 Otros procedimientos descritos para obtener una gammaglobulina tolerable por vía intravenosa se basan en modificar químicamente y de forma parcial las moléculas de

IgG, tratándolas con agentes de reducción (Wiederman et al. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 113: 609-613; 1963), alcoholación (Patente española Nº 412552), alquilación (Patente española Nº 0533908) y sulfonación (Yamanaka T., et al. Vox Sang., 37: 14-20; 1979).

En base a la cromatografía de intercambio iónico se han descrito procesos que eliminan los contaminantes indeseables de los materiales de partida que se utilizan para la obtención de gammaglobulina (Patentes: US 3869436, española Nº 518181, EP 91300790 y WO 94/29334). Sarno M.E., et al. (Patente EP 0440483) revela una combinación de técnicas útiles para facilitar la preparación intravenosa del producto en base a cromatografía de intercambio iónico y diafiltración a pH ácido débil.

La formulación final del preparado es especialmente importante para la adecuada estabilización del producto. La preparación liofilizada fue la inicialmente aceptada por el estado del arte al presentar el producto una menor alteración durante su almacenamiento. Se han publicado composiciones para producto liofilizado aceptables para administración intravenosa que ejercen una protección frente a la desnaturalización de la gammaglobulina, principalmente durante la operación de liofilización (Patente española Nº525246), utilizando carbohidratos, polioles, glicol o derivados, aminoácidos, así como por la presencia de seroalbúmina.

Más recientemente se han descrito formulaciones líquidas estables que utilizan carbohidratos, en un medio acuoso de muy baja fuerza iónica y pH 4,25 (Patente US 4396608), o a pH débilmente ácido 5-6 (Patente EP

0278422).

Entonces, y de acuerdo al estado del arte, las gammaglobulinas intravenosas hasta la fecha comercializadas pertenecen a alguno de los siguientes tres grupos, los cuales se distinguen básicamente por su procedimiento de elaboración:

1ª generación, obtenidas por métodos enzimáticos (pepsina, tripsina, plasmina, ...)

2ª generación, modificadas químicamente (reducción, sulfonación, alquilación, tratamiento con beta-propiolactona, ...)

3ª generación, correspondientes a moléculas de IgG intactas (diafiltración a pH bajo, cromatografía, precipitación con polietilenglicol, formulación a pH ácido y baja fuerza iónica)

La administración intravenosa de los actuales preparados ya no dan reacciones de intolerancia grave, si bien cada uno de ellos presenta algún tipo de desventaja terapéutica, inconveniente o contraindicación. Así, los productos tratados enzimáticamente resultan con una semivida media "in vitro" más corta (unos 8 días) que la gammaglobulina G normal (20 días-25 días), nula capacidad de opsonización (ausencia del fragmento Fc), pueden presentar fragmentación y una muy limitada cantidad de las subclases IgG 3 e IgG 4.

Las gammaglobulinas obtenidas por modificación química presentan una semivida media "in vitro" (de 10 días-15 días) menor a la fisiológica, mantienen la capacidad de opsonización e integridad molecular, pero según el tratamiento pueden sufrir una reducción de su capacidad bacteriolítica y formar nuevos determinantes

antigénicos (tratamiento con beta-propiolactona).

Más recientemente se han obtenido gammaglobulinas intactas por métodos que evitan la desnaturalización de las moléculas de IgG. En algunos
5 casos, los procedimientos de obtención desarrollados pueden ser asimismo acoplables al fraccionamiento con etanol, de modo que es factible tomar como material de partida alguna de las fracciones ricas en gammaglobulina separadas por los métodos de Cohn, Cohn-Oncley o
10 Kistler-Nischmann, por ejemplo.

De acuerdo a los procedimientos revelados hasta la actualidad, para la elaboración de IgG intacta se recurre al tratamiento moderado a pH ácido, diafiltración
a pH ácido, estabilización de las moléculas de IgG a baja
15 fuerza iónica y pH 4,25. Con estos métodos se consigue reducir suficientemente el nivel de formas de IgG agregadas (polímeros de alto peso molecular y oligómeros intermedios hasta dímeros inclusive) aumentándose la
proporción de IgG monomérica. La formulación líquida final
20 a pH 4,25 inhibe la reagregación de las moléculas de IgG durante su almacenamiento, manteniéndose estable en solución (pero sólo a la temperatura de conservación de 2°C-8 °C) con un nivel suficientemente bajo la actividad
anticomplementaria.

25 El principal problema de las preparaciones líquidas obtenidas exclusivamente por tratamientos de acidificación es la reversibilidad del efecto inhibitorio de la actividad anticomplementaria inducida por la reducción de pH, recuperándose de nuevo dicha actividad al
30 reestablecer las condiciones de pH del medio a valores fisiológicos o próximos. Por contra, la inocuidad de la

infusión por vía intravenosa de grandes volúmenes de preparados de gammaglobulina formulados a un valor tan ácido de pH (pH 4,25) es bastante cuestionable (en neonatos y pacientes con trastornos renales).

5 En otros procedimientos de purificación se emplean resinas intercambiadoras de iones, catiónicas y/o aniónicas, que se aplican a las soluciones procedentes de los precipitados intermedios del fraccionamiento etanólico de Cohn o Cohn-Oncley (fracciones II+III o fracción II, 10 preferentemente), o bien directamente al pool de plasma evitando el fraccionamiento con etanol. La gammaglobulina así purificada puede combinarse con alguno de los anteriores procedimientos de acidificación (intermedia o en formulación) u otro procedimiento equivalente para su 15 formulación líquida, de lo contrario debe preservarse su estabilidad en forma liofilizada.

Los intercambiadores iónicos utilizados por la técnica están constituidos por ligandos del tipo aniónico fuerte (etil-amonio cuaternario: QAE) y débil 20 (dietil-amino etil: DEAE), o catiónico fuerte (sulfo-propil: SP) y débil (carboxi-metil: CM). Los ligandos se hallan covalentemente inmovilizados a soportes o matrices insolubles cuya composición puede ser: silícea (cerámicas), acrílica (poliacrilamidas, poliestireno), 25 carbohidratada (celulosa, dextrano, agarosa). Principalmente la formadas por dextrano (Sephadex, de Amersham-Pharmacia) o agarosa (Sephacrose, de Amersham-Pharmacia) son la más eficientes y utilizadas. Sin embargo, presentan algunos inconvenientes no resueltos 30 aun por la técnica, y se refieren, según el caso, a la elevada cantidad de resinas necesarias para una separación

efectiva de las proteínas contaminantes y su impacto con respecto a la recuperación de gammaglobulina G y en la correcta distribución de subclases, esencialmente la IgG 4. La situación de compromiso creada entre purificación
5 (eliminación de proteínas contaminantes: IgA, IgM y otras) y recuperación de IgG (IgG4) se resuelve, según el caso, a favor de un u otro lado, de ahí que la eficacia y calidad terapéutica de las gammaglobulinas comercializadas puedan ser muy diferentes entre ellas.

10 Mediante el fraccionamiento del plasma con PEG, o bien por precipitación con PEG a partir de una fracción intermedia de Cohn o equivalente, como la fracción II+III, es factible obtener una gammaglobulina liofilizada.....
administrable por vía intravenosa, pero puede mostrarse
15 insuficientemente estable en estado líquido. Si se incluye un tratamiento intermedio de pasteurización (previo a la precipitación con PEG) se produce una notable agregación molecular, incluso en presencia de estabilizantes (como el
sorbitol, por ejemplo), debido principalmente a la
20 presencia de proteínas inestables. Como los agregados
superiores deben de eliminarse totalmente en etapas....
posteriores, ello provoca una sensible disminución de la recuperación de producto. Si se parte de fracciones más
purificadas (fracción II, o equivalente), los agregados de
25 alto peso molecular presentes en el material de partida,
o generados por pasteurización, no son esencialmente
separables por medio de la precipitación con PEG en las condiciones que establecen las técnicas descritas en la actualidad. Estas indican concentraciones de PEG del 4-5%
30 a pH 4-6 (Coval L., supra) y de 4-10% de PEG a pH 4,8-6,5 (Uemura Y. et al., supra) que serían válidas

exclusivamente cuando la gammaglobulina se hallase en presencia de otras proteínas acompañantes (presentes en la fracción II+III, por ejemplo) capaces de coprecipitar junto a los agregados de alto peso molecular.

5 El método de la presente invención mejora sustancialmente el estado actual de la técnica, ya que mediante una combinación innovadora de etapas de proceso, efectuadas en las condiciones precisas que se detallan en la presente patente, dan como resultado una gammaglobulina
10 virtualmente exenta de contaminantes proteicos detectables, por las técnicas analíticas más sensibles, y sin que ello ponga en compromiso la integridad molecular o la recuperación y distribución de subclases de IgG, manteniendo una baja capacidad para fijar espontáneamente
15 el complemento.

La seguridad del producto, en cuanto al riesgo potencial de transmisión de virus, es máxima en el procedimiento que relatan los inventores. En este se han introducido los métodos de pasteurización en presencia de
20 un azúcar-alcohol (por ejemplo sorbitol) y/o del solvente-detergente con tri-n-butil fosfato (TnBP) y polisorbato-80 (Tween-80) o equivalentes, como etapas principales de inactivación controlada de virus, las cuales son altamente eficientes y complementarias. A estas
25 etapas se ha adicionado la acción viricida de un tratamiento previo a pH ácido eventual, el cual eliminaría o atenuaría el contenido de virus antes de proceder a las etapas principales de inactivación. También eventualmente, la solución del producto puede ser nanofiltrada para la
30 retención de virus, durante el tratamiento a pH ácido o preferentemente en bulk diafiltrado previo a la

concentración y formulación final.

La combinación de los anteriores métodos de eliminación de virus aportan al producto la máxima seguridad vírica y supera el estado del arte de los productos con una sola etapa individual de inactivación, con la gran ventaja industrial que las etapas (eventualmente hasta cuatro) del método de la invención pueden efectuarse de forma consecutiva, y por tanto, en una única zona de inactivación o nivel único de seguridad.

Los inventores descubrieron, sorprendentemente, que a partir de un material intermedio del fraccionamiento alcohólico de Cohn (fracción II+III, preferentemente), podía extraerse prácticamente toda la gammaglobulina en presencia de un carbohidrato (azúcar-alcohol preferentemente), ajustando las condiciones de extracción de la IgG en función del volumen de dilución, pH y fuerza iónica, y separar una parte importante de las proteínas acompañantes por precipitación con PEG. El sobrenadante resultante (filtrado) era un líquido exento de partículas y coloides, lo cual posibilitaba una posterior adsorción en columna de intercambio iónico de forma altamente eficiente, hallándose el efluente resultante prácticamente exento de contaminantes indeseables (IgA, IgM, enzimas proteolíticos, ...), sin que ello comprometiera el rendimiento de la IgG o la distribución de subclases.

De forma más sorprendente, los inventores comprobaron que en el efluente de columna altamente purificado y en las condiciones específicas propias de la invención, podía reducirse ampliamente el PEG y el etanol residual presentes por ultrafiltración, y concentrar la proteína a voluntad. Ello permitía posteriores

tratamientos de inactivación vírica (eventual tratamiento a pH ácido, pasteurización, solvente-detergente) encadenados y sin producir una desnaturalización profunda (detectable por la ausencia de formación de partículas y coloides), ni apenas agregación (1-2 % de polímeros solubles de alto peso molecular). Este reducido contenido de polímeros es atribuible a la presencia de un carbohidrato (entre otros componentes) que estabilizan la solución en todas las operaciones que preceden a la pasteurización.

Los inventores también descubrieron, muy sorprendentemente, un método diferente a los descritos por la técnica para eliminar o reducir los reactivos de inactivación viral por solvente-detergente, adicionados en la etapa precedente, en base a precipitar la gammaglobulina con PEG y mantener los reactivos químicos diluidos en solución y a baja temperatura para favorecer la reducción del contenido de micelas. Luego, separar el precipitado por microfiltración en flujo tangencial, y seguidamente proceder al lavado del material retenido para conseguir desplazar totalmente dichos reactivos. El precipitado era solubilizado directamente en el mismo equipo de microfiltración al ponerlo en contacto con una solución apropiada y sin necesidad de manipulación física.

La solución obtenida por el procedimiento descrito, a pesar de contener sólo un 1-2% de polímeros, no se consideró aceptable para su administración intravenosa. Los inventores observaron, sorprendentemente, que diluyendo apropiadamente el anterior precipitado solubilizado, de forma que se alcanzase unas determinadas concentraciones de PEG y del carbohidrato (previamente

añadido), se insolubilizaban los agregados de alto peso molecular cuando se llevaba a un determinado rango de pH, y estos se separan totalmente de la mayoría de los monómeros y dímeros de la solución. Se comprobó que la
5 concentración del carbohidrato (preferentemente un azúcar-alcohol), así como del PEG, eran determinantes para evitar la coprecipitación de monómeros/dímeros de IgG y recuperar la máxima IgG en la solución. El precipitado formado podía separarse fácilmente por microfiltración tangencial o por filtración convencional. El filtrado
10 resultante, exento de agregados, diafiltrado por ultrafiltración a unas condiciones concretas de proceso que forman parte de la invención, daba lugar a un producto que eventualmente podría filtrarse por membranas de retención de virus y finalmente concentrarse (al 5% ó 10%
15 de gammaglobulina) con ausencia o muy bajo contenido de los reactivos químicos adicionados en el proceso.

El método de la invención supera el estado actual del arte solventando totalmente las deficiencias
20 habituales de las anteriormente citadas gammaglobulinas comerciales. La gammaglobulina obtenida (al 10% de concentración de IgG) se halla prácticamente exenta (o no detectable) de: polímeros o agregados de alto peso molecular (monómeros + dímeros >99%, y preferentemente
25 >99,9%); contaminantes proteicos distintos de la gammaglobulina; IgA (<0,003 mg/ml); IgM (<0,002 mg/ml); PKA (<2,77 UI/ml) y calicreína; plasmina y plasminógeno; albúmina; tri-n-butil fosfato (<3,6 ppm); polisorbato-80 (<50 ppm); PEG-4000 (<500 ppm). Presenta un alto contenido
30 de las subclases más lábiles IgG 3 e IgG 4, e integridad molecular (fragmento Fc >100%), con baja capacidad para la

activación espontánea del complemento (ACA < 1 CH50/mg proteína). La formulación líquida con sorbitol es estable, por lo menos 2 años, tanto a 2°C-8°C como hasta 25°C. Junto a las excelentes características de producto, se le agrega la máxima seguridad aportada en cuanto al riesgo de transmisión de virus a través de un derivado plasmático, teniendo en cuenta la capacidad potencial de inactivación del solvente-detergente, la pasteurización, la eventual incubación a pH ácido, y la eventual filtración de virus (nanofiltración), así como las etapas de proceso que contribuyen a reducir la carga viral (precipitación con etanol, precipitación con PEG, adsorción por carga iónica, etc.). Por otro lado, es importante reseñar que el proceso íntegro puede efectuarse en menos de 5 días en unas instalaciones adecuadas y el rendimiento de IgG final puede superar los 4,5 g por litro de plasma de partida.

A continuación se explicará de manera detallada el procedimiento objeto de la presente invención.

Se parte de una precipitado rico en IgG obtenido por fraccionamiento etánolico del plasma humano, preferentemente de la fracción II+III del método de Cohn. Cada kg de dicho precipitado se suspende en una solución acuosa, preferentemente a razón de 5 kg a 25 kg de una solución que contiene un carbohidrato, preferentemente un azúcar-alcohol, y más preferentemente sorbitol a una concentración (p/v) comprendida entre el 2% hasta el 10%. Como amortiguador de pH se utilizan preferentemente iones fosfato y acetato, a una concentración tal que el pH de la suspensión acuosa de la fracción II+III se halla entre 4,8 y 5,8, y la conductividad no excede de 2 mS/cm. Después de un tiempo mínimo de agitación, preferentemente superior a

1 hora, se procede a precipitar la mayoría de las globulinas extraídas acompañantes a la IgG con PEG de peso molecular nominal de 4000 preferentemente, en un rango de concentración (p/p) del 2,5% hasta el 5,5%, y a la
5 temperatura preferente de 2°C-8°C. Seguidamente, y antes de proceder a la separación del precipitado, se añade preferentemente un adsorbente de lípidos y lipoproteínas, como por ejemplo la bentonita, así como preferentemente un coadyuvante de filtración, como por ejemplo el
10 Hyflo-supercel o Celite (ambos comercializados por J. Manville) o equivalentes, de forma tal que favorezca la filtrabilidad de la suspensión. El precipitado formado es retenido preferentemente por filtración-prensa utilizando hojas o placas filtrantes de profundidad de celulosa
15 (grados, 50 SA de la marca Cuno, o KS-80 o K-200 de la marca Seitz, o equivalentes) de forma que el filtrado obtenido tiene una turbidez inferior a 5 NTU (unidades nefelométricas de turbidez). Opcionalmente, el precipitado puede separarse de forma combinada por centrifugación y
20 filtración. Si el precipitado ha sido retenido por filtración-prensa, este puede ser lavado con una solución apropiada ajustada a una concentración de PEG, iones fosfato-acetato y pH, equivalente a las condiciones de
ajuste de la precipitación, favoreciendo ello una mayor
25 recuperación de IgG.

El filtrado obtenido se lleva a un pH de entre 5,7 a 6,3, preferentemente por adición de solución diluida de hidróxido sódico, y se somete a clarificación en línea con la inyección a una columna de intercambio iónico.

30 La columna de intercambio iónico contiene resinas con ligando aniónico, preferentemente las del tipo

dietil amino-etil (DEAE), unida a una matriz insoluble del tipo agarosa, o preferentemente DEAE-agarosa, y comercialmente conocidas por Sepharose, preferentemente las que poseen alta capacidad dinámica (FF o fast-flow).

5 La columna utilizada, preferentemente es del tipo de distribución en flujo radial, siendo preferentemente con un recorrido (o altura de lecho) de entre 8 cm-15 cm. El filtrado se ajusta a una caudal preferentemente inferior a cuatro volúmenes de columna por hora, inyectándose en la
10 columna que contiene empaquetadas las resinas, hasta agotar la solución, de forma tal que la cantidad introducida, equivalente a material de partida inicial (fracción II+III, preferentemente), se halla preferentemente entre 1 g-2,5 g por ml de resinas. Una vez
15 finalizada la carga de la solución, se lava la columna preferentemente con 2,5 volúmenes hasta 4,5 volúmenes de columna de una solución de fuerza iónica y pH similar a la solución del producto previamente inyectada.

El líquido efluente durante la carga y lavado,
20 o excluido de columna (fracción no adsorbida), se ultrafiltra con el fin de reducir el contenido de PEG y obtener la adecuada concentración de proteína para llevar a cabo las posteriores etapas de inactivación vírica. La membrana de ultrafiltración preferente tiene un corte
25 molecular nominal de 100 kDa, y preferentemente construida con polisulfona (o sus derivados) de las marcas comerciales Millipore o Pall-Filtron. Inicialmente la solución se ajusta a pH entre 5,0 y 5,5 por adición de un ácido débil (por ejemplo acético diluido) y se mantiene a
30 la temperatura de 2°C-8°C, iniciándose la filtración a una presión transmembrana de entre 1,5 bar-2 bar,

preferentemente. Después de reducir el volumen, preferentemente hasta la mitad del inicial, se diafiltra preferentemente a volumen constante empleando, preferentemente, entre 1-3 volúmenes de agua para
5 inyección. Luego, se lleva el pH de la solución a 4,0-4,8, y preferentemente entre 4,2-4,6, por adición de un ácido mineral. La presión transmembrana se ajusta a un valor inferior a 1,2 bar, y preferentemente entre 0,5 bar y 1,0 bar, y opcionalmente se concentra de nuevo mediante
10 reducción del volumen actual hasta la mitad. Se diafiltra, preferentemente por adición de no menos de 3 volúmenes de una solución que contiene un azúcar-alcohol,.... preferentemente sorbitol a la concentración (p/v) de entre... 2%-10% ajustado al pH de 4-5 con ácido acético. Finalmente
15 se concentra de proteína hasta el valor requerido, preferentemente hasta una densidad óptica (a 280 nm) superior a 45 UA (unidades de absorción), siendo posteriormente esterilizada por filtración, usando... membrana absoluta de 0,22 micras, preferentemente.
20 Opcionalmente, la solución esterilizada y estabilizada (con el azúcar-alcohol procedente de la solución de diafiltración), puede conservarse durante largo período de tiempo a la temperatura de 2°C-8°C.

En el momento de continuar el proceso, la
25 solución enfriada a 2°C-8°C puede llevarse eventualmente a pH ácido, preferentemente entre 3,75 a 4,25, por adición lenta de un ácido mineral diluido a la temperatura de 2°C-8°C. Preferentemente, la solución eventualmente ajustada de pH, se incuba a 2°C-40°C durante 0,5 horas a
30 48 horas, y más preferentemente a pH entre 3,95-4,05 entre 35°C-38°C durante 1 hora a 4 horas, en presencia del

azúcar-alcohol, preferentemente sorbitol al 2%-10% (p/v) añadido en la diafiltración previa. También eventualmente, y durante el tratamiento a pH ácido por ejemplo, la solución puede filtrarse de virus a través de una membrana de poro nanométrico, preferentemente con tamaño de poro comprendido entre 15 nm y 50 nm, como por ejemplo los filtros de 50 nm (DV50 de la marca Pall), de 35 nm (BMM-Planova 35N de la marca Asahi), de 20 nm (DV20 de la marca Pall), de 15 nm (BMM-Planova 15N de la marca Asahi), o de poros equivalentes.

Finalizado el eventual tratamiento a pH ácido, se lleva a 2°C-8°C y se alcaliniza la solución por adición... preferente de una base fuerte diluida alcanzando el pH un... valor comprendido entre 4,7 y 5,2. Se añade seguidamente un carbohidrato como estabilizante, preferentemente un azúcar-alcohol y más preferentemente sorbitol, a una concentración (p/p) final preferente de entre 25%-35%. Se pasteuriza a 60°C-62°C durante 10 horas-12 horas, preferentemente en ambos casos.

A continuación, se diluye la solución con agua para inyección hasta que la concentración del carbohidrato o preferentemente del azúcar-alcohol, sea inferior al 25% (p/p) y la proteína se halle comprendida entre 1% y 3% (p/v). Una vez enfriada la solución a temperatura ambiente, se añade una solución concentrada de una mezcla de solvente-detergente, formada preferentemente por los reactivos alquil-fosfato y detergente no iónico, y más preferentemente por el tri-n-butil fosfato y el polisorbato-80, de forma tal que la concentración final (p/v) se halla preferentemente al 0,3% y 1% de los dos reactivos respectivamente. La incubación se efectúa a

24°C-28°C durante un período de entre 4 horas-8 horas preferentemente en ambos casos. (La solución inactivada de virus se halla a partir de entonces en una área de seguridad viral exclusiva para productos inactivados, dentro de la cual se efectúan las operaciones restantes).

Posteriormente se diluye la solución con agua fría para inyección, preferentemente adicionando entre 1 kg a 2 kg del agua por cada kg de solución, precipitándose prácticamente toda la proteína presente por adición de suficiente cantidad de PEG (de peso molecular 4000 preferentemente), llevando la solución a una concentración final (p/p) entre 12% y 17% de PEG, y ajustando... previamente el pH entre 7,0 y 9,0, preferentemente entre... pH 7,8 y 8,4, a la temperatura preferente de 2°C-8°C.

Después de un tiempo prudencial de homogeneización, preferentemente superior a 1 hora (en agitación) y de un eventual reposo, se inicia la retención del precipitado en un equipo de filtración sobre membrana de flujo tangencial (TFF), separándose el líquido filtrado, que contiene entre otros, los reactivos de inactivación utilizados en la anterior etapa solvente-detergente. La membrana de filtración tangencial preferente es la construida con fluoruro de polivinilideno (PVDF) de la marca Millipore (configuración Prostack o modelos equivalentes). Otros materiales compatibles con los reactivos que contiene la solución, como la polisulfona, puede opcionalmente utilizarse en lugar del PVDF. El tamaño de poro de la membrana de filtración se halla entre 0,1 micras y 0,45 micras, preferentemente. La separación del filtrado se lleva a cabo a una presión transmembrana inferior a 1,5 bar.

Una vez el volumen de la suspensión inicial se ha reducido hasta 4 veces-8 veces preferentemente, se inicia el lavado del precipitado retenido por adición a volumen constante de una solución que contiene PEG, preferentemente a la misma concentración que la usada en la precipitación precedente, y preferentemente el mismo carbohidrato utilizado en la pasteurización, preferentemente un azúcar-alcohol, a una concentración (p/p) entre 5% y 20% preferentemente. Después de consumir preferentemente entre 4 volúmenes y 6 volúmenes de la anterior solución de lavado se procede a solubilizar el retenido con una solución ácida a un pH inferior a 5,5 que... contiene preferentemente el mismo carbohidrato utilizado... en las etapas anteriores. Preferentemente la solución esta formada por ácido acético entre 1 mM y 10 mM a la cual se añade un azúcar-alcohol a una concentración (p/p) preferente entre 5% y 20%, y se ajusta con un álcali hasta pH 4,0-4,5. La temperatura de la solución no excede de 37°C, y preferentemente se halla entre 2°C-8°C. Se añade una cantidad de solución ácida para la solubilización entre 2,5 veces y 4,5 veces la cantidad de suspensión. De esta forma la concentración (p/p) final de PEG se sitúa entre 2% y 4%, y preferentemente entre 2,8% y 3,4%, hallándose el azúcar-alcohol preferentemente entre 5% y 20%. Se deja la solución de solubilización en contacto con el precipitado retenido mediante recirculación hasta lograr su total disolución.

El producto solubilizado se lleva a un pH comprendido entre 7,5 y 8,5, y preferentemente entre 7,8 y 8,3, por adición de un hidróxido alcalino diluido o una base débil aceptable, siendo la temperatura preferente de

2°C-8°C. Después de homogeneizar, el precipitado formado puede separarse preferentemente a través del mismo equipo de TFF anteriormente utilizado, recuperándose el filtrado como producto de interés. Otra forma de proceder es la
5 sustitución del equipo de TFF por filtros de membrana, placa o cartuchos multicapa (profundidad) desechables.

El filtrado obtenido, libre de agregados de alto peso molecular así como de la mayor parte de los reactivos del solvente-detergente, se lleva a pH entre 5-6
10 preferentemente, por adición de ácido diluido.

La solución se ultrafiltra con el fin de reducir el contenido de PEG y de otros compuestos de bajo peso molecular, y obtener la adecuada concentración de proteína... para ajustar el producto a la formulación final. La
15 membrana de ultrafiltración preferente tiene un corte molecular nominal de 100 kDa, y preferentemente construida por polisulfona (o sus derivados) de las marcas comerciales Millipore y Pall-Filtron. Se inicia la ultrafiltración a una presión transmembrana de entre 1,5
20 bar-2 bar, preferentemente. Después de reducir el volumen, preferentemente hasta 1/2 a 1/3 del inicial, se diafiltra preferentemente a volumen constante, empleando preferentemente 1 volumen de agua para inyección. Luego, se lleva el pH de la solución a 4,0-4,8 y preferentemente
25 entre 4,2-4,6 por adición de un ácido mineral diluido. La presión transmembrana se ajusta a un valor inferior a 1,2 bar, y preferentemente entre 0,5 bar y 1,0 bar, y se concentra de nuevo mediante reducción del volumen actual hasta 1/2 a 1/3 del inicial. Se diafiltra preferentemente
30 por adición de no menos de 5 volúmenes de una solución que contiene un azúcar-alcohol, preferentemente sorbitol a una

concentración (p/v) de entre 2%-10% ajustado al pH de 4-5 con ácido acético. La anterior solución diafiltrada y preferentemente concentrada al 1%-3% (p/v) de proteína, se ajusta de pH entre 4.4 y 5.0 si fuese necesario y se calienta preferentemente a $25 \pm 5^\circ\text{C}$. Después se procede a una eventual filtración de virus por membranas de retención de poro nanométrico igual o inferior a 50 nm nominal, y preferentemente de 20 nm nominal aproximadamente (DV20 de la marca Pall) con una recuperación de proteína superior al 90% y una productividad superior a 1 kg de proteína/m² de área de filtración en menos de 24 horas de proceso, o también... preferentemente las comprendidas entre 15-20 nm nominales... (BMM-Planova 15N o P21, ambas de la marca Asahi; VNF "Parvo" de Millipore) con recuperación de proteína superior al 80%.

Finalmente se concentra de proteína por ultrafiltración con membranas de 100 kDa, o menor tamaño de corte molecular nominal, hasta el valor requerido, preferentemente hasta una densidad óptica (a 280 nm) final aproximadamente de 75 UA, para obtener una concentración de IgG del 5%, ó a unas 150 UA para la concentración del 10%.

La solución, adecuadamente formulada según la concentración del estabilizante (azúcar-alcohol) de la solución de diafiltración, se lleva a un pH de 5-6 y se clarifica por filtros de profundidad (grado 90LA de la marca Cuno, o equivalente). Se esteriliza por filtración absoluta usando membrana de 0,22 micras y luego se dosifica a envases de vidrio. El producto pasa una cuarentena mínima de 15 días a 25°C , mostrándose la

solución translúcida y exenta de partículas visibles. El producto es estable a las temperaturas de 2°C-8°C y hasta 25°C.

5 A continuación se describen varios ejemplos de aplicación como información no limitativa de la invención:
Ejemplo 1

Se suspendieron 90,0 kg de la pasta fracción II+III (lote nº 9003; equivalentes a 1490,9 litros de plasma de partida), obtenida según el método de Cohn, en
10 1323 kg de una solución de extracción formada por fosfato disódico 5 mM y sorbitol a un 5% (p/v) ajustada a pH 4,83 por adición de 23,0 l de ácido acético 0,5 M. Después de...
1 hora en agitación y de ajustar el pH de la suspensión a...
5,05 por adición de 1,4 l de ácido acético 0,5 M, se dejó
15 2 horas más en agitación entre 2°C-6°C. Se comprobó que el pH no había variado y la conductividad era de 1,05 mS/cm. Luego, y bajo suficiente agitación, se añadieron 135,5 kg de solución de PEG-4000 (al 50%). Seguidamente se
adicionaron 3600 g de bentonita, y después de reajustar el
20 pH a 5,03 con 2 l de ácido acético 0,5 M, se dejó precipitar durante unas 4 horas en reposo. Justo antes de proceder a la separación del precipitado por filtración, se añadió bajo agitación Hyflo-supercel a razón de 32,5 g
por cada kg de suspensión y seguidamente se filtró por
25 placas de profundidad (marca Cuno, grado 50 SA) empleando un filtro-prensa adecuado para la retención del precipitado. Por un lado, se recogieron en total 1768 kg de líquido filtrado (que incluía un post-lavado), transparente y ligeramente amarillento, con una densidad
30 óptica (a 280 nm) de 8,38 UA y una turbidez de 2,7 NTU, y por otro lado se obtuvieron 188,3 kg de precipitado que se

desecharon.

La anterior solución filtrada se ajustó a pH 5,92 por adición de 8000 ml de hidróxido sódico 0,5 M, siendo la conductividad de la solución resultante de 1,113 mS/cm.

Con suficiente antelación se preparó una columna de flujo radial (marca Sepragen) de intercambio de iones que contenía 50 l de resinas DEAE-Sepharose FF (de Amersham-Pharmacia), empaquetadas radialmente con un espesor de lecho de unos 10-12 cm. La columna fue equilibrada con una solución de acetato sódico y ácido acético de fuerza iónica y pH equivalentes a la solución del producto. Posteriormente se inyectó en columna la solución del producto, filtrándose en línea durante la carga, a un caudal tal que la duración del proceso fue de 12 horas y 18 min. Finalmente se efectuó un post-lavado con 180 kg de la solución del equilibrado previo de columna. Se recogieron en total 1930 kg del efluente de columna (fracción no adsorbida), que contenía esencialmente IgG como único componente proteico, con un pH de 5,99, conductividad de 1,081 mS/cm, turbidez de 2,4 NTU y densidad óptica (a 280 nm) de 6,95 UA.

La solución se ajustó a pH 5,19 por adición de 13 l de ácido acético 0,5 M y se concentró hasta 1030 kg por ultrafiltración con membranas de 100 kDa de corte molecular marca Biomax A-2 (de Millipore), a una presión transmembrana de 1,95-2,20 bar y a unos 4°C de temperatura, desechándose el filtrado con densidad óptica (a 280 nm) <0,150 UA. Seguidamente se diafiltró a volumen constante con 2054 kg de agua para inyección, siendo la conductividad final de la solución retenida de 0,164

mS/cm. Luego, y sin detener la ultrafiltración, se llevó a pH 4,26 por adición de ácido clorhídrico 0,2 M frío y se continuó la diafiltración a volumen constante, en esta ocasión frente a 3833 kg de solución de sorbitol al 5% (p/p) y ácido acético 2 mM ajustada a pH 4,12, a una presión transmembrana de 1,05-1,10 bar y a unos 4°C. Finalmente, se concentró el retenido hasta que su densidad óptica (a 280 nm) alcanzó 72,7 UA. Luego, se post-lavó el equipo con la solución de diafiltración de forma que se obtuvieron 233,5 kg del bulk con una densidad óptica (a 280 nm) de 55,5 UA, procediéndose luego a la esterilización por filtración a través de membrana de 0,22 micras de poro (filtro tipo CVGL de Millipore).

La solución esterilizada y enfriada a 6,0°C, se llevó a pH 4,00 por adición lenta de 7250 ml de ácido clorhídrico 0,2 M frío, monitorizando el pH durante dicha adición. Después se precalentó rápidamente la solución bulk en un depósito con camisa de calefacción y bajo agitación, termostatazándose a 36,5°C-37,3°C durante 4 horas.

Finalizado el tratamiento se enfrió la solución y se estabilizó por adición de 114,3 kg de sorbitol sólido, agitándose hasta su total disolución. Se llevó el pH de la solución hasta 4,85 por adición lenta de 7000 ml de hidróxido sódico 0,2 M frío. Se obtuvieron 388,8 kg de la solución, con una turbidez de 1,41 NTU y densidad óptica (a 280 nm) de 36,0 UA. Inmediatamente se pasteurizó dicha solución entre 60,1°C-60,7°C durante exactamente 10 horas.

Posteriormente se enfrió y diluyó por adición de 131 kg de agua para inyección fría, obteniéndose una

densidad óptica (a 280 nm) de 27,5 UA. A los 507 kg de la solución diluida actual se le añadieron 51,2 kg de solución concentrada de SD, formada por tri-n-butil fosfato al 3% (p/v) y polisorbato-80 (Tween-80) al 10%
5 (p/v), y se incubó entre 25,8°C y 26,4°C durante 6 horas exactamente.

Inmediatamente la solución tratada con SD se diluyó con 841,5 kg de agua para inyección fría y se ajustó el pH a 8,05 por adición de 4200 ml de hidróxido
10 sódico 0,5 M, añadiéndose luego, lentamente y bajo agitación, 654,3 kg de solución de PEG-4000 al 50%,
dejándose precipitar a la temperatura de 2,6°C-3,8°C.

Los 2065 kg de la anterior suspensión de precipitado con PEG se concentraron hasta 400 kg en un
15 equipo de microfiltración en flujo tangencial (TFF) por membrana de 0,22 micras de poro (tipo Prostack de Millipore), a una presión transmembrana de 0,1-0,3 bar y
a 3,6°C-5,0°C. Posteriormente se lavó a volumen constante la suspensión del precipitado retenido en el TFF con 2000
20 kg de una solución de contenía PEG al 15% (p/p) y sorbitol
al 8% (p/p) ajustada a pH 7,97.

A continuación, la suspensión retenida se solubilizó al adicionar 1226 kg de solución de sorbitol
14% (p/p) y ácido acético 4 mM ajustada a pH 4,14 con
25 hidróxido sódico. La solución se dejó en contacto recirculando en el equipo de TFF hasta solubilización total (25 min). A continuación se llevó el pH de la solución a 8,03 por adición lenta de 6500 ml de hidróxido sódico 0,5 M y, después de unos 15 min de agitación, se
30 inició la filtración por el mismo equipo de TFF (con membranas de 0,22 micras de poro) recuperándose la IgG en

el filtrado. Después de recoger 1474 kg del filtrado, se inició un lavado de la suspensión retenida con una solución de características de composición similares a la suspensión, obteniéndose finalmente 1827 kg de filtrado total. El pool de filtrado tenía una densidad óptica (a 280 nm) de 5,66 UA, turbidez de 1,99 NTU y conductividad de 0,158 mS/cm.

La solución se llevó a pH 5,53 por adición de 3000 ml de ácido acético 0,5 M y se concentró por ultrafiltración con membranas de 100 kDa de corte molecular (serie Omega de Pall-Filtron) a una presión transmembrana de entre 1,75-1,95 bar, reduciéndose el volumen hasta obtener 739 kg. Se diafiltró a volumen constante frente a 736 kg de agua para inyección, añadiéndose posteriormente 5600 ml de ácido clorhídrico 0,2 M hasta pH 4,51. Luego, se redujo la presión transmembrana a 0,6-0,9 bar y se concentró hasta 296 kg, iniciándose inmediatamente una diafiltración a volumen constante frente a 2072 kg de solución de sorbitol 5% (p/p) que contenía ácido acético 2 mM ajustada a pH 4,16. Una vez consumida la anterior solución, se concentró hasta un valor de densidad óptica de 142,5 UA, con el fin de preparar dos soluciones a las concentraciones de IgG del 5% y del 10%. Dichas soluciones ajustadas a pH 5,25 se filtraron por placa de profundidad (marca Cuno, grado 90 LA) y membrana absoluta de 0,22 micras de poro (tipo CVGL de Millipore), dosificándose posteriormente a frascos de vidrio de 10 ml, 50 ml, 100 ml y 200 ml. El rendimiento de producción final de las soluciones ajustadas, en cuanto a gramos de IgG por litro de plasma de partida, fue de 4,68.

Ejemplo 2

Se procesaron varios lotes de IGIV, cada uno a partir de 90 kg de fracción II+III, de la forma descrita en el método de la invención, sometién dose el producto final (IGIV 5% en vial de 50 ml) a un riguroso control analítico con el fin de comprobar la consistencia de su calidad. Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla 1.

Tabla 1

Parámetro	Nº de lotes de proceso				
	9002	9003	0001	0002	0003
Proteína (%)	4,6	4,5	4,7	4,8	N.D.
Turbidez (NTU)	3,3	3,3	3,0	3,1	2,8
Sorbitol (%)	4,75	4,85	4,9	N.D.	N.D.
Pureza (%)	100	99,2	99,7	99,8	99,9
Polímero (%)	0	0	0	0	0
Fraciones (%)	0	0	0	0	0
PEG (ppm)	164	311	224	N.D.	N.D.
Polisor-bato (ppm)	<30	<30	34	<30	40
TNBP (ppm)	<3,6	<3,6	<3,6	<3,6	<3,6
PKA (UI/ml)	<2,8	<2,8	<2,8	<2,8	<2,8
ACA (CH50/mg Ig)	0,68	0,76	0,75	0,66	0,63
IgA (mg/ml)	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003
IgM (mg/ml)	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002

N.D., no determinado.

La proteína se determinó por la técnica de Bradford usando gammaglobulina como patrón. La turbidez se midió por nefelometría cuantificándose con respecto a una

solución patrón. Se determinó la pureza de gammaglobulina con respecto al total de proteínas detectadas por electroforesis en placa de acetato de celulosa y tinción con negro amido. Los polímeros (o agregados moleculares superiores a dímeros de gammaglobulina) y las fracciones proteicas de bajo peso molecular, se determinaron por HPLC en columna de exclusión en gel (columna TSK G-3000 SW de Toyosoda), cuantificándose el % de la distribución de las formas moleculares indicadas con respecto al total de proteínas detectado, según valor de densidad óptica a 280 nm. El PEG se determinó por columna de filtración en gel HPLC (columna TSK G-3000 SWXL) utilizando un detector de índice de refracción. La concentración de sorbitol se cuantificó por un método enzimático. El polisorbato-80 se analizó por un método colorimétrico y el TNBP mediante cromatografía de gases. El activador de precalicreína (PKA) se midió por ensayo cromogénico. Las proteínas acompañantes IgA e IgM se determinaron por inmunonefelometría. La actividad anticomplementaria (ACA) se determinó según método de la Eur.Pharm. basado en la determinación del complemento residual tras incubarlo en presencia o ausencia de la muestra.

Ejemplo 3

En el proceso de la invención los reactivos químicos de inactivación vírica añadidos son reducidos por precipitación con PEG y lavado en un equipo de TFF. Después de algunas investigaciones, se estableció un método sencillo que de forma indirecta permitía monitorizar durante el proceso de TFF la concentración de dichos reactivos. Teniendo presente que la densidad óptica a 280 nm del filtrado por TFF procede básicamente de la

concentración del detergente no iónico y de restos de proteínas solubles que escapan junto al líquido filtrado (el PEG no absorbe en el rango de 245-280 nm), se procedió a corregir la aportación de la proteína por lectura a 245 nm en la cual se detecta un mínimo de absorción de ésta y que contrariamente es muy elevada para el detergente (aproximadamente 14,5 veces superior a la proteína, en el caso del polisorbato-80 comercial).

Entonces, y en base a lecturas de densidad óptica a 280 nm y 245 nm, se efectuó el seguimiento de la etapa de proceso de TFF para demostrar la eficacia de la concentración y lavados de cara a la reducción del SD. De acuerdo al procedimiento de medición desarrollado, se cuantificó el SD residual correspondiente al proceso del anterior Ejemplo 1. Los resultados se indican en la tabla 2.

Tabla 2

	Opera- ción de TFF	Cantidad de producto retenido (kg)	Densidad óptica del filtrado (UA a 280 nm)	Densidad óptica del filtrado (UA a 245 nm)	Cociente de densidad óptica a 245/280 nm	% de D.O. (a 280 nm) aportado por el SD en el filtrado (1)	% de recu- peración del SD en el retenido (2)
5	Inicio concen- tración	2065	0,339	N.D.	n.a.	n.a.	n.a.
10	Final concen- tración	400	0,346	4,72	13,6	94	95,94
15	1º volumen de lavado: 400 kg	400	0,156	1,82	11,6	80	36,81
20	2º volumen de lavado: 800 kg	400	0,080	0,790	9,87	68	16,05
25	3º volumen de lavado: 1200 kg	400	0,046	0,345	7,6	52	7,06
30	4º volumen de lavado: 1600 kg	400	0,050	0,190	3,8	26	3,83
35	5º volumen de lavado: 2000 kg	400	0,030	0,137	4,5	31	2,74

(1) El % de D.O. a 280 nm procedente del SD se calculó a

partir del cociente de D.O. (245 nm/280 nm), dividido por el factor de absorción relativa a 245 nm entre SD y proteína de 14,5, y multiplicado por 100.

5 (2) El % de recuperación de la concentración de SD se ha calculado de acuerdo a los valores de D.O. a 280 nm de la etapa correspondiente con respecto al hallado al inicio de concentración (0,339), corregido por el % de D.O. aportado (aproximadamente) por el SD, de acuerdo a la siguiente expresión: % recuperación = (lectura D.O.(280 nm) /
10 0,339) x (% de D.O. del SD / 100).

N.D., no determinado.

n.a., no aplicable.

Los resultados muestran la evolución de la reducción del SD (polisorbato-80) durante la concentración
15 y lavado, obteniéndose al final, después de 5 volúmenes de lavado, sólo el 2,74 % de la concentración inicial. Por consiguiente, el factor de reducción es de 36,5 veces:
(100% / 2,74%) que corregido por el incremento de concentración de proteína de x 5 (2065 kg / 400 kg), se
20 obtiene un factor de reducción real de 182 veces. Entonces, y de acuerdo a los anteriores valores, se calcula que la concentración de polisorbato-80 en el precipitado retenido sería algo inferior a 100 ppm y a una concentración de proteína aproximada del 2%.

25 Obviamente, para alcanzar una concentración de <100 ppm al 5% y 10% de proteína, aun debe reducirse más de 5 veces la cantidad del polisorbato presente. Ello es posible con el posterior uso de membranas de ultrafiltración de 100 kDa, puesto que la concentración
30 del polisorbato se ha reducido suficientemente hasta un valor próximo al de formación de micelas, posibilitado

ello su separación. Para el lote del presente Ejemplo, la concentración hallada en producto final (al 5% de IgG) fue < 30 ppm, inferior al límite de cuantificación de la técnica analítica.

5 Otros dos lotes nº 8006 y 8007, fueron procesados a escala preparativa de la misma forma que en el presente Ejemplo 3. Se precipitó con PEG, concentrándose y lavándose en un equipo de TFF con el mismo tipo de membranas anteriormente utilizadas, si bien
10 en esta ocasión el número de volúmenes de solución de lavado fueron de 4 y 2,5 para los lotes nº 8006 y 8007, respectivamente. Después de diafiltrar y concentrar por membranas de 100 kDa hasta la concentración final (del 5% de IgG), se determinó la concentración de polisorbato
15 residual de cada lote en producto final (IGIV 5%). Los valores hallados (incluyendo el lote nº 9003) se reflejan en la tabla 3.

Tabla 3

Nº de proceso	Nº de volúmenes de lavado (en el TFF)	Concentración de polisorbato en producto final IGIV 5% (ppm)
9003	5	<30
8006	4	50
8007	2,5	200

20 Los resultados de la anterior tabla 3 muestran la dependencia entre la cantidad de polisorbato residual
25 y el número de volúmenes de lavado, demostrando que el

lavado por TFF, y en las condiciones de la invención, es una etapa clave para la reducción efectiva del detergente no iónico (polisorbato). De los valores hallados puede establecerse un mínimo de 4 volúmenes de lavado para asegurar restos inferiores a 100 ppm en producto final.

Ejemplo 4

Se procesaron varios lotes de IgG de acuerdo al método de la invención, cada uno de ellos a partir de 90 kg de fracción II+III. Una vez obtenida la solución purificada por columna de DEAE-Sepharose FF que contenía aproximadamente un 4% de PEG-4000, se ultrafiltró en todos los casos por una superficie de 27,6 m² de membranas de polisulfona marca Biomax A-2 de Millipore de 100 kDa de corte molecular nominal, en condiciones equivalentes a las descritas en el ejemplo 1. Las concentraciones de proteína (según valores de densidad óptica) y de PEG-4000 obtenidas, se muestran en la tabla 4.

Tabla 4

Nº DE LOTE	PROTEÍNA (D.O. 280 nm, en UA)	CONCENTRACIÓN PEG-4000 (mg/ml)
9002	49,6	5,20
9003	55,5	4,92
0001	55,9	4,92
0002	54,1	4,83
0003	54,9	5,91

La concentración de PEG-4000 se determinó por HPLC en una columna de exclusión en gel y usando un detector de índice de refracción.

En otro ensayo, realizado con un lote (nº 9001)

a escala preparativa (a partir de 8 kg de fracción II+III), se llevó hasta la etapa del efluente de columna DEAE-Sepharose FF. Se ultrafiltró por membranas Biomax A-2 de 100 kDa de corte molecular, en las condiciones
5 descritas en el ejemplo 1 adaptadas al tamaño de lote. En esta ocasión, a diferencia del ejemplo 1, se diafiltró frente a sorbitol 5% y sin ajustar el pH del producto a 4,2-4,6, efectuándose la diafiltración a una presión transmembrana superior a 1,5 bar. Al final, la
10 concentración proteica aproximada correspondía a una D.O. (280 nm) de 45 UA y la concentración de PEG era 33 mg/ml, o sea unas 6 veces superior a los valores hallados en la
tabla 4. El producto, procesado hasta pasteurización, generó un 4% de agregados, comportándose de forma
15 diferente a los lotes de la tabla 4 cuyos incrementos fueron de sólo un 1,0%-1,5% de dichos agregados.

Los resultados de la tabla 4 demuestran que el
procedimiento de ultrafiltración de la invención
(relativos a pH y presión transmembrana) resuelve muy
20 satisfactoriamente el objetivo de reducir eficientemente
el PEG para poder llevar la solución a las concentraciones
de proteína y PEG adecuadas para los posteriores
tratamientos de inactivación de virus.

Ejemplo 5

25 De acuerdo a la condiciones de la invención, se procesaron varios lotes de producto. Éstos, antes de efectuar la ultrafiltración final, se llevaron a pH entre 5,4-5,6 y se concentraron 2,5 veces por membranas de 100 kDa, a una presión transmembrana de aproximadamente 1,5-2
30 bar. Luego se lavaron con 1 volumen de agua para inyección y seguidamente se ajustaron de pH entre 4,3-4,5 por

adición de ácido clorhídrico 0,5 M, reduciéndose la presión transmembrana a un valor inferior a 1 bar, y se concentraron 2,5 veces más el volumen de sus respectivas soluciones. Finalmente se diafiltraron con 7 volúmenes de una solución de sorbitol 5% (p/p) que contenía ácido acético 2 mM ajustada a pH 4,2 con hidróxido sódico.

Los resultados de concentración de PEG residual en el producto final se hallan en la anterior tabla 2, con valores alrededor de los 200 ppm (0,02 %) al 5% de IgG. Teniendo en cuenta que la concentraciones de PEG y IgG de la solución previa a la ultrafiltración fueron respectivamente del 3,25% y 4 mg/ml aproximadamente, el factor de reducción de PEG (corregido según proteína) es de 1000-2000 veces.

Al igual que en los lotes anteriores, se efectuó una prueba a escala preparativa de la forma descrita en la invención según el Ejemplo 1 adaptado al tamaño de lote. Se llevó la solución de partida a pH 5,0 aproximadamente y se concentró unas 4 veces por membranas de 100 kDa de corte molecular. Luego se diafiltró a volumen constante en el mismo equipo frente a 9 volúmenes de solución de sorbitol al 5% a una presión transmembrana superior a 1,2 bar. Los valores de concentración de PEG y proteína, así como el factor de reducción de PEG, se hallan en la tabla 5.

Tabla 5

	Fase	Concentración de PEG (mg/ml)	Concentración de proteínas (mg/ml)	Factor de reducción PEG (corregido) (1)
	Solución de partida (2)	32,5	3,76	1
5	Solución concentrada x 4 veces	55,6	14,9	2,31
	1ª VD con sorbitol 5%	n.d.	14,9 (aprox.)	n.a.
10	3ª VD con sorbitol 5%	14,5	14,9 (aprox.)	8,74
	5ª VD con sorbitol 5%	11,6	14,9 (aprox.)	11,08
15	7ª VD con sorbitol 5%	8,4	14,9 (aprox.)	15,43
	9ª VD con sorbitol 5% y concentración final	20,5	62,8	26,18
20	IGIV 5% (final)	15,2	51,4	28,80

(1) El factor de reducción se ha corregido en función de la concentración proteica.

(2) Solución de partida correspondiente al filtrado con PEG 3,25% pH 8.

25 n.d., no determinado

n.a., no aplicable

Los resultados de la tabla 5 reflejan una discreta transferencia de PEG a través de membranas de 100 kDa en las condiciones de la prueba, debido principalmente al pH del medio >4,8 y a la presión transmembrana > 1,2 bar. Por tanto, se comprueba que en las condiciones concretas de la invención la reducción de PEG es mucho más

eficiente, en una magnitud del orden de unas 50 veces (comparación de los factores de reducción de 1000-2000 de los lotes anteriores y de 28,8 de la prueba actual).

Ejemplo 6

5 La pasteurización intermedia de la solución de gammaglobulina, así como el posterior tratamiento de inactivación químico por solvente-detergente, apenas induce a la agregación molecular.

10 Se procesaron varios lotes a escala industrial (a partir cada uno de 90 kg de fracción II+III) de acuerdo al método de la invención que con detalle se describe en el Ejemplo 1. Una vez efectuada la incubación a pH ácido, la solución de gammaglobulina a un 3,5% de concentración, se estabilizó por adición de sorbitol hasta una
15 concentración final aproximada del 33% (p/p) y el pH se ajustó a $4,80 \pm 0,05$ por adición de hidróxido sódico 0,5 M, hallándose la densidad óptica (a 280 nm) entre 35,6 UA y
41,2 UA. Seguidamente se pasteurizó en bulk en un depósito con camisa de calefacción, a 60-61°C durante 10 horas. La
20 solución se diluyó con agua fría para inyección hasta una densidad óptica (a 280 nm) entre 25,9 UA y 28,0 UA, de forma que la concentración de sorbitol era < 25% (p/p) en todos los casos. Se enfrió a 25°C-26°C y se adicionó
solución concentrada (x 10 veces) de solvente-detergente
25 hasta conseguir unas concentraciones finales (p/v) del 1% de polisorbato-80 y del 0,3% de tri-n-butil fosfato. Después de mezclar durante unos 30 min se dejó incubando 6 horas a 25°C-26°C.

30 Se determinó el contenido de polímeros o agregados de alto peso molecular (determinados por HPLC) de la solución antes y después de pasteurizar, y después

del tratamiento con solvente-detergente. También se cuantificó la generación de partículas coloidales durante la pasteurización por medida nefelométrica de la turbidez. Los valores obtenidos se han tabulado en tabla 6.

5

Tabla 6

Nº LOTE	% DE POLÍMEROS (O AGREGADOS DE ALTO PESO MOLECULAR)			TURBIDEZ (NTU)	
	Antes de pasteu- rizar	Después de pas- teurizar	Después del SD	Antes de pasteu- rizar	Después de pas- teurizar
9002	n.d.	1,23	N.D.	1,5	1,6
9003	n.d.	1,16	1,97	1,4	1,8
0001	n.d.	1,04	1,19	5,9	1,8
0002	n.d.	1,21	1,30	2,3	2,4
0003	n.d.	1,35	1,15	1,7	2,0

10

n.d., no detectable

N.D., no determinado

15

Los resultados demuestran que tanto los tratamientos de pasteurización como de solvente-detergente efectuados en las condiciones descritas de temperatura, tiempo y composición del material (estabilizante, concentraciones de proteína y PEG, pH, ...), no promueven la desnaturalización de la gammaglobulina, teniendo en cuenta el discreto aumento de agregados (<2%) y turbidez. Asimismo, a la concentración (de aproximadamente el 3,5%) de gammaglobulina del proceso es posible procesar grandes cantidades por lote de producción.

20

25

Ejemplo 7

Se efectuaron varias pruebas para establecer las mejores condiciones de carga para la purificación en

columna de resinas intercambiadoras de iones.

A partir de un mismo lote de fracción II+III se realizaron varias pruebas a escala preparativa tomando 1 kg del material de partida, hasta obtener la solución filtrada procedente de la primera precipitación con PEG, de acuerdo al método de la invención.

Para cada prueba, la cantidad requerida de solución ajustada a pH 5,9-6,0 se clarificó (filtro de 0,5 micras) e inyectó a una columna de 65 mm ó de 90 mm de diámetro empacitada con resinas DEAE-Sepharose FF (de Amersham-Pharmacia) hasta 13 cm - 17 cm de altura (excepto en un caso que se indica). La carga se efectuó a 2°C-8°C y a un caudal tal que la duración fue de 12-15 horas ó de 6 horas según el caso, recogiendo todo el efluente de columna y su correspondiente post-lavado realizado en cada prueba con 3,5 volúmenes de columna de acetato sódico 10 mM ajustado a pH 5,95+/-0,05 con ácido acético.

En la tabla 7 se reflejan los valores de la recuperación de gammaglobulina y de la pureza electroforética (en acetato de celulosa) del efluente.

Tabla 7

RELACIÓN DE CARGA (g de fracción II+III / ml de resina)	TIEMPO DE CARGA (horas)	PUREZA DEL EFLUENTE (electroforesis)		RECUPERACIÓN DE GAMMAGLOBULINA (%) (2)
		Albúmina (1)	(%) gamma	
4,0	12-15	(+)	97,2	97
2,5		(-)	98,7	95
2,25		(-)	98,3	105
1,25		(-)	97,7	97
0,875		(-)	100	98
0,625		(-)	100	100
1,65	6	(+++)	85,6	n.d.

n.d., no determinado

(1) Los símbolos: (-) indica ausencia detectable; (+) indicios; (+++) presencia abundante (contaminante mayoritario).

(2) Cálculo de la recuperación en % de acuerdo al valor de proteína total (según D.O. a 280 nm) y pureza (electroforética) del efluente de columna con respecto a la solución de carga inicial.

Aplicando una carga de 2,5 g de fracción II+III por ml de resinas ó inferior, se consigue una adsorción casi total de los contaminantes principales detectables: por electroforesis (ausencia de albúmina) y sin que ello repercuta en la recuperación de gammaglobulina, la cual es excelente en todo el rango estudiado. Sin embargo, se restringe de forma preferencial el rango inferior de carga a 1 g fracción II+III por ml de resinas para evitar la utilización de columnas de volumen excesivo. Por otro lado, y como cabía esperar, el caudal de inyección a unas resinas de matriz de agarosa resultó ser un factor

relevante, siendo necesarias unas 12 horas de contacto en condiciones de flujo continuo.

Se realizó un proceso (lote nº 9001) a escala preparativa (a partir de 8 kg de fracción II+III), de acuerdo a la descripción del ejemplo 1 pero ajustado al tamaño de lote indicado, con el fin de conocer específicamente la reducción de algunas de las principales proteínas acompañantes por adsorción en columna. Se aplicó una relación de carga de 1,8 g de fracción II+III por ml de DEAE-Sepharose FF y un tiempo de contacto de unas 12 horas aproximadamente, determinándose la concentración de IgA, albúmina y transferrina tanto en el efluente de columna como en la solución antes de columna. Los valores obtenidos se hallan en la tabla 8.

Tabla 8

PROTEÍNA	Antes de columna	Después de columna	% de recuperación (1)
IgA (mg/ml)	0,16	<0,003	<2
Albúmina (mg/ml)	0,248	<0,0018	<1
Transferrina (mg/ml)	0,043	0,002	5
IgG (mg/ml)	5,15	4,49	94,7

La cuantificación de las proteínas se ha efectuado por inmunonefelometría.

(1) El % de recuperación se ha calculado teniendo en cuenta la cantidad absoluta de la proteína hallada en las

soluciones posterior y anterior a la columna.

De la tabla 8 se desprende que a las condiciones específicas de la invención, las resinas son altamente selectivas y eficientes para la separación de las principales proteínas asociadas a la IgG presentes en la fracción II+III de partida. Sólo cantidades discretas de transferrina son detectables en el efluente junto a la IgG. La elevada recuperación de IgG es un buen indicador del mantenimiento de la proporción de subclases en el efluente de columna.

Ejemplo 8

A partir de una solución de gammaglobulina I.V. altamente purificada se simularon las condiciones de la etapa de tratamiento a pH ácido (pH 4,0) para el estudio del efecto de protección del sorbitol, concentración de gammaglobulina y tiempo de incubación, así como su repercusión en la posterior etapa de pasteurización.

Se tomaron muestras de un mismo lote de IGIV al 5% (Flebogamma de Instituto Grifols) y se efectuó una prueba para comprobar el efecto protector del sorbitol durante los ajustes de pH en zona ácida, cuando se llevó a pH 4,00-4,05 con ácido clorhídrico 0,5 M y a temperatura ambiente de 20°C-25°C. Asimismo, también se realizaron otras pruebas para valorar el efecto de la concentración de gammaglobulina al diluir la IGIV 5% de partida con solución de sorbitol 5%, así como la temperatura a la cual se efectuaba el ajuste de pH 4,0, fuese ambiente de 20°C-25°C o en frío de 2°C-8°C. Después de una incubación a pH 4,0 durante 1 hora y posterior pasteurización a 60°C-61°C durante 10 horas en presencia de sorbitol al 33%, se procedió a la cuantificación de los agregados o

polímeros detectables por D.O. a 280 nm mediante HPLC. Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla 9.

Tabla 9

SORBITOL (%)	PROTEÍNA (%)	Ajuste de pH 4,0 a 20°C-25°C		Ajuste de pH 4,0 a 2°C-8°C
		Agregados % (después de incubación a pH 4)	Agregados % (después de pasteurizar)	Agregados % (después de incubación a pH 4)
5	0,25	N.D.	N.D.	n.d.
	1	0,31	0,57	n.d.
	2	0,34	0,64	N.D.
	2,5	N.D.	N.D.	n.d.
	3	0,37	1,01	N.D.
	4	0,93	1,57	N.D.
	5	0,83	1,81	0,43
5	5	0,86	3,50	
10		0,15	0,83	
20		0,10	N.D.	
33		n.d.	0,70	

n.d., no detectable.

N.D., no determinado.

En todos los casos la IGIV de partida no contenía agregados (n.d.).

15

Los resultados ponen de relieve la protección que ejerce el sorbitol cuando se efectúan variaciones de pH en la zona ácida, y de una forma más acusada cuando mayor es la temperatura. A temperatura ambiente, es

necesaria una concentración del 10% ó superior de sorbitol para una protección eficiente de la gammaglobulina al 5% (o concentración superior). La concentración de gammaglobulina promueve una mayor agregación, no obstante
5 efectuando el ajuste de pH 4,0 a 2°C-8°C se pueden alcanzar concentraciones de hasta el 5% de proteína (ó más diluidas, preferentemente a un 3,5±0,5%) que se estabilizarían con sólo un 5% de sorbitol, y serían aceptables para la incubación a pH ácido y pasteurización
10 posterior. Efectuando el ajuste de pH a temperatura de 2°C-8°C, sólo se apreció una discreta agregación (0,43% de polímero) a la concentración superior estudiada del 5% de gammaglobulina con 5 % de sorbitol, mostrándose sensiblemente inferior que al ajustar el pH a 20°C-25°C
15 (con 0,83% de polímero). Esta menor agregación con la disminución de la temperatura, el rango de concentración de proteína, así como por la protección que ejerce el sorbitol, justifican las condiciones establecidas en las distintas etapas del procedimiento de la invención.
20 El tiempo de incubación a pH ácido (pH 4,0 y 36-37°C) se estudió, en cuanto a formación de agregados, con gammaglobulina (Flebogamma) y sorbitol a dos diferentes concentraciones de ambos y a la temperatura de ajuste de pH a 2°C-8°C. Los resultados obtenidos se hallan
25 en la tabla 10.

Tabla 10

SORBITOL (%)	PROTEÍNA (%)	TIEMPO A pH 4 (horas)	Agregados % (después del tratamiento a pH 4)	Agregados % (después de la pasteurización)
5	2,5	1	n.d.	0,35
		2	0,30	0,59
		4	n.d.	0,32
5	6	0	0,11	0,36
		1	0,07	0,31
		4	0,07	0,41
		8	0,40	1,11
		12	0,43	1,18
		24	0,15	0,58

n.d., no detectable.

Los resultados ponen de manifiesto la validez de las dos composiciones empleadas para efectuar la incubación a pH ácido y pasteurización posterior en presencia de sorbitol al 33%. El tiempo de incubación válido se hallaría en el rango máximo estudiado de 0 a 24 horas, con un posible óptimo a las 4 horas de exposición a 36-37°C.

Ejemplo 9

Las condiciones óptimas de pasteurización se determinaron a partir de una IGIV 5% altamente purificada (Flebogamma), directamente al 5% de concentración (conductividad de unos 450 microS/cm) o por dilución 1:1 con agua para inyección hasta el 2,5% (conductividad de unos 225 microS/cm). A cada una de las soluciones se les añadió sorbitol hasta un 33% (p/p), ajustándose a diferentes pH con ácido clorhídrico 0,5 M. Después de

someter cada muestra de diferente concentración y pH a un tratamiento térmico de 10 horas a 60°C-61°C, se analizó por HPLC la distribución molecular para determinar el grado de agregación (polímeros o agregados de alto peso molecular, y dímeros). Los valores obtenidos se reflejan en la tabla 11.

Tabla 11

(%) PROTEÍNA	pH	(%) POLÍMEROS	(%) DÍMEROS
2,5	5,52	0,46	4,36
	5,03	0,35	3,49
	4,72	0,30	3,31
	4,51	0,45	3,34
5	4,2	4,89	4,54
	4,0	14,42	5,60
	3,8	24,51	6,23

El contenido de polímero en la IGIV 5% utilizada como material de partida es indetectable.

Los resultados muestran que es factible pasteurizar a 60°C-61°C durante 10 horas a muy baja fuerza iónica y a una concentración proteica de 2,5% aproximadamente, en un medio estabilizado con sorbitol y en un rango de pH de 5,5 a 4,5, cuyo óptimo se halla entre pH 4,7 y 5,0, con un incremento de agregados (polímeros y dímero) mínimo.

Ejemplo 10

Se efectuaron varios ensayos para determinar la capacidad del método de la invención para eliminar los agregados de alto peso molecular procedentes (generados) de las etapas anteriores de inactivación vírica.

Las soluciones pasteurizadas en presencia de sorbitol al 33% y posteriormente tratadas con TNBP al 0,3% y polisorbato-80 al 1% de distintos lotes procesados de acuerdo al método de la invención, se diluyeron con agua para inyección en una relación de 1 kg a 1,5 kg del agua por cada kg de solución, y luego se enfriaron a 2°C-8°C. Seguidamente se les añadió PEG-4000 para llevarlas a diferentes concentraciones y se les ajustó el pH entre 7,5 y 8,1. Después de dejar precipitar los agregados de alto peso molecular, las suspensiones se filtraron por un tamaño de poro de 0,5-0,1 micras, obteniéndose en cada caso un líquido transparente que contenía la IgG purificada.

Se cuantificó el % de polímeros por HPLC de cada prueba, reflejándose los valores hallados en la tabla 12.

Tabla 12

Nº de proceso	Concentración de PEG (%)	pH final	Solución de partida (% de polímero)	Solución filtrada (% de polímero)
61/50	3,00	7,88	2,31	0,00
63/53	3,00	7,62	2,94	0,35
65/58	3,15	7,51	0,88	0,33
63/60	3,15	8,06	2,94	0,00
77/61	3,23	7,75	2,28	0,08
7014/1	3,27	7,99	1,28	0,00
62/59	3,45	7,47	0,84	0,00

El valor no detectable (n.d.) por HPLC se ha indicado en esta ocasión como 0,00.

Se detecta una eliminación total de polímeros en

el rango de concentraciones de PEG del 3,00% al 3,45%, si bien existe una interacción con el pH del medio mostrándose más efectiva la separación cuando el pH se halla entre 7,75 y 8,06. Al valor más bajo de pH estudiado de 7,47, se requiere una concentración de al menos 3,45% de PEG para eliminar totalmente el polímero, ya que concentraciones inferiores (por ejemplo: PEG 3,15%-pH 7,51) no se consiguen precipitar totalmente dichos polímeros y podrían dejar restos en la solución filtrada.

La presencia del estabilizante sorbitol actúa, asimismo, evitando la coprecipitación de las especies no agregadas (monómero y dímero) junto con el polímero, mejorando en gran medida la recuperación de producto en dicha precipitación. Para determinar el efecto de la presencia del sorbitol, se efectuaron unas pruebas de precipitación y recuperación de proteína (según densidad óptica) a diferentes condiciones de concentración. Se realizó un ensayo a partir de una solución de IGIV 5% purificada (sin polímeros detectables) diluyéndose ésta hasta una densidad óptica (a 280 nm) de unas 6 UA, empleando según el caso agua o sorbitol al 10%, y se ajustó a pH de 8,0. Se dejó precipitar durante al menos 1 hora y luego se observó la presencia de precipitado. Se repitió el mismo ensayo con una solución de IgG procedente de las etapas de inactivación vírica del proceso de la invención (con un contenido de polímero de 3,97%), diluyéndose en esta ocasión con sorbitol 5% o agua, y después de precipitar y separar los agregados por filtración, se determinó el % de recuperación de proteína del filtrado con respecto al inicial.

Los resultados obtenidos se reflejan en la

siguiente tabla 13.

Tabla 13

5

CONCEN- TRACIÓN DE PEG (%)	pH	% POLÍMERO EN LA SOLUCIÓN DE IGIV DE PARTIDA	CONCEN- TRACIÓN DE SORBITOL (%)	PRESEN- CIA DE PRECI- PITADO (1)	(%) RECUPE- RACIÓN DE PROTEÍNA EN EL FILTRADO (2)
3,0	8,0	n.d.	0,4	SI (+++)	N.R.
			5	SI (+)	N.R.
			10	NO (-)	N.R.
		3,97	9,4	SI (+++)	83,6
			13,0	SI (+++)	92,2

10

(1): El número de signos + indica la cantidad de precipitado detectado: (+++) abundante; (+) incipiente; (-) negativo.

(2): Porcentaje del total de proteína hallada en la solución filtrada con respecto a la solución inicial antes de precipitar.

n.d., no detectable.

15

N.R., no realizado.

20

Las concentraciones de sorbitol superiores al 5% previenen la precipitación del monómero/dímero de IgG cuando se hallan presentes como únicas especies en la solución de IGIV (exenta de polímero), detectándose por la ausencia de precipitado al adicionar PEG. Asimismo, cuando se eliminan los polímeros contenidos en la solución de IgG se observa una mejor recuperación de IgG (libre de polímeros), a la mayor concentración de sorbitol estudiada (13%). En consecuencia, la presencia de sorbitol durante

la precipitación de polímeros o agregados de alto peso molecular es beneficiosa para prevenir la coprecipitación y obtener una óptima recuperación de IgG.

Ejemplo 11

5 La filtración de virus se ensayó comparativamente a escala preparativa empleando filtros comerciales de tamaño de poro nanométrico, utilizándose para ello dos diferentes materiales de partida obtenidos de acuerdo al ejemplo 1: solución ajustada a pH ácido
10 (pH=4.00±0.05) a 36±1°C (material A), y solución diafiltrada final al 2.5±0.5% de proteína, pH 4.5±0.1 y a 26±1°C (material B). Los resultados obtenidos en cuanto a cantidad filtrada con respecto al área de filtración...
15 utilizada, el tiempo invertido y la recuperación de proteína, según los filtros usados (Planova 35N, Planova 15N y DV20), se refleja en la tabla 14.

Tabla 14

TIPO DE FILTRO	MATERIAL-A				MATERIAL-B			
	Volumen filtrado (l/m ²)	Proteína filtrada (kg/m ²)	Tiempo de filtración (h)	% Recuperación de proteínas	Volumen filtrado (l/m ²)	Proteína filtrada (kg/m ²)	Tiempo de filtración (h)	% Recuperación de proteínas
Planova 35N (35 nm)	213	6,77	1,53	99,2	300	6,97	1,58	93,9(*)
					249	5,45	3,00	96,8
					289	6,83	3,55	96,6
DV20 (Pall) (20 nm)	48,3	1,43	16,9	94,5	64,8	1,44	24	93,4
					51,7	1,14	15,9	94,8
Planova 15N (15 nm)	34,0	0,99	16,2	87,1	31,0	0,59	14,9	83,1
					34,0	0,75	24,0	91,0

(*) Recuperación obtenida previa al post-lavado.

De la anterior tabla se desprende que tanto el material A como el B son adecuados para la filtración de virus, sea por tamaño de poro de 35 nm o incluso menor, hasta 15 nm. Sin embargo, un tamaño de poro cercano a 20 nm parece ser el más apropiado, teniendo en cuenta los parámetros de recuperación de proteína (>90%) y productividad (>1 kg/m²) frente a la capacidad de eliminación de virus por tamaño de poro del filtro.

Todo cuanto no afecte, altere, cambie o modifique la esencia del procedimiento descrito, será variable a los efectos de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Método para la producción de gammaglobulina G humana inactivada de virus, caracterizado porque se efectúa la extracción de la gammaglobulina de una fracción aislada por fraccionamiento con etanol en presencia de un carbohidrato, y después de reducir el contenido de contaminantes con PEG, se aplica a una columna de resinas de intercambio aniónico obteniéndose un efluente cuyo contenido de PEG es posteriormente reducido por ultrafiltración y se concentra para llevar a cabo de forma secuencial un eventual tratamiento a pH ácido y al menos una de las siguientes etapas de inactivación vírica, consistentes en una pasteurización y un tratamiento con solvente-detergente, siendo después el producto precipitado y lavado con PEG para eliminar los eventuales reactivos químicos de inactivación vírica y luego, por solubilización y cambio de pH, los contaminantes proteicos, y finalmente purificado por ultrafiltración para reducir el volumen y el contenido de PEG, efectuando luego una eventual filtración de virus y posterior concentración hasta el valor de proteína del 5% ó 10%.

2. Método para la producción de gammaglobulina G humana inactivada de virus, según la reivindicación 1, caracterizado porque la fracción aislada por fraccionamiento con etanol es preferentemente la fracción II+III.

3. Método para la producción de gammaglobulina G humana inactivada de virus, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el carbohidrato es preferentemente un azúcar-alcohol, y más preferentemente sorbitol, a una concentración (p/v) comprendida entre 2%

y 10%.

4. Método para la producción de gammaglobulina G humana inactivada de virus, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la precipitación con PEG
5 se efectúa a la concentración (p/p) del 2,5% hasta 5,5%, y a un pH de 4,8-5,5.

5. Método para la producción de gammaglobulina G humana inactivada de virus, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el pH de la solución
10 inyectada en columna de resinas se ajusta entre 5,7 y 6,3.

6. Método para la producción de gammaglobulina G humana inactivada de virus, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la columna de intercambio
15 aniónico contiene preferentemente resinas DEAE-agarosa y admite una carga entre 1 g a 2,5 g de la fracción II+III por ml de resinas preferentemente.

7. Método para la producción de gammaglobulina G humana inactivada de virus, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el efluente de columna se
20 ultrafiltra por membranas de 100 kDa de corte molecular nominal, diafiltrándose preferentemente frente a no menos de 3 volúmenes de una solución que contiene un azúcar-alcohol, preferentemente sorbitol a la
concentración (p/v) del 2%-10%, a unas condiciones de pH
25 de 4,0-4,8 y presión transmembrana inferior a 1,2 bar.

8. Método para la producción de gammaglobulina G humana inactivada de virus, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el eventual tratamiento
a pH ácido se efectúa más preferentemente a pH 3,95-4,05
30 a 35°C-38°C durante 1 hora a 4 horas, y en presencia de un azúcar-alcohol, preferentemente sorbitol a la

concentración (p/v) del 2%-10%.

5 9. Método para la producción de gammaglobulina
G humana inactivada de virus, según las reivindicaciones
anteriores, caracterizado porque después de la
pasteurización en presencia de una azúcar-alcohol
preferentemente, y más preferentemente de sorbitol a la
concentración (p/p) del 25%-35%, se diluye con agua para
inyección hasta una concentración del azúcar-alcohol del
25% (p/p) ó inferior, y una concentración (p/v) de
10 proteína comprendida entre 1%-3%, antes de efectuar el
tratamiento de inactivación químico con
solvente-detergente.

15 10. Método para la producción de gammaglobulina
G humana inactivada de virus, según las reivindicaciones
anteriores, caracterizado porque la solución inactivada de
virus con solvente-detergente se diluye con agua para
inyección, añadiendo preferentemente entre 1 kg - 2 kg por
cada kg de solución y una vez ajustada de pH entre 7,0 y
9,0, y preferentemente entre pH 7,8-8,4, se precipita por
20 adición de PEG hasta una concentración (p/p) final
comprendida entre 12% y 17%.

25 11. Método para la producción de gammaglobulina
G humana inactivada de virus, según las reivindicaciones
anteriores, caracterizado porque la suspensión del
precipitado con PEG se separa sobre membrana de filtración
en flujo tangencial, de 0,1 micras a 0,45 micras de poro
preferentemente, mediante reducción de volumen del orden
de 4 veces a 8 veces el valor inicial, preferentemente.

30 12. Método para la producción de gammaglobulina
G humana inactivada de virus, según las reivindicaciones
anteriores, caracterizado porque el precipitado con PEG

retenido por la membrana de filtración en flujo tangencial se lava en el mismo equipo, preferentemente por adición de 4 ó más volúmenes, de una solución de características de composición iguales o similares a las condiciones de precipitación.

13. Método para la producción de gammaglobulina G humana inactivada de virus, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la suspensión del precipitado con PEG lavado, se solubiliza en el mismo equipo de filtración en flujo tangencial por adición de una solución ácida a un pH inferior a 5,5 que contiene un carbohidrato, preferentemente formada por ácido acético a la concentración de 1 mM a 10 mM ajustada, a la cual se añade preferentemente un azúcar-alcohol a una concentración (p/p) del 5% al 20%, preferentemente ajustada a pH 4,0-4,5 con un álcali.

14. Método para la producción de gammaglobulina G humana inactivada de virus, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la cantidad de la solución ácida de solubilización a añadir a la suspensión del precipitado con PEG lavado se halla entre 2,5 veces y 4,5 veces la cantidad de dicha suspensión, siendo la concentración (p/p) final de PEG del 2% al 4%, y preferentemente del 2,8% al 3,4%, y la concentración (p/p) del carbohidrato, preferentemente del azúcar-alcohol, del 5% al 20%.

15. Método para la producción de gammaglobulina G humana inactivada de virus, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el producto solubilizado se ajusta a un pH de 7,5 a 8,5 por adición de un álcali, precipitándose y separándose preferentemente por

filtración, los agregados insolubles de alto peso molecular.

16. Método para la producción de gammaglobulina G humana inactivada de virus, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el filtrado esencialmente libre de agregados de alto peso molecular, se diafiltra y concentra por membranas de ultrafiltración de 100 kDa de corte molecular nominal una vez ajustado el pH a 4,0-4,8, preferentemente frente a no menos de 5 volúmenes de una solución que contiene un azúcar-alcohol, preferentemente sorbitol a la concentración (p/v) del 2%-10%, a una presión transmembrana inferior a 1,2 bar y concentración de proteína del 1% al 3% (p/v) preferentemente.

17. Método para la producción de gammaglobulina G humana inactivada de virus, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la solución diafiltrada y preferentemente concentrada al 1%-3% (p/v) de proteína, ajustada a un pH comprendido entre 4.4 y 5.0, se calienta preferentemente a $25 \pm 5^\circ\text{C}$, procediéndose luego a una eventual separación de virus por nanofiltración por membranas de poro nominal igual o inferior a 50 nm y preferentemente de 20 nm aproximadamente con recuperación de más del 90% de la proteína y productividad de filtración superior a 1 kg prot./m² de área, o también preferentemente la comprendida entre 15-20 nm con recuperación superior al 80% de proteína.

18. Método para la producción de gammaglobulina G humana inactivada de virus, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la solución diafiltrada y eventualmente filtrada de virus, se concentra por ultrafiltración, por membrana de 100 kDa de corte

molecular nominal o poro de inferior tamaño, hasta el 5% ó 10% (p/v) preferentemente, y después de un ajuste de pH a 5-6 y filtraciones clarificante y estéril, en su envase final contiene más del 99% de las formas moleculares monomérica-dimérica y preferentemente superior al 99,9%, ausencia de partículas visibles y turbidez inferior a 5 NTU, ausencia de cantidades detectables de IgA (inferior a 0,003 mg/ml) e IgM (inferior a 0,002 mg/ml), PEG inferior a 500 ppm, detergente no iónico inferior a 50 ppm y disolvente orgánico no detectable (inferior a 3,6 ppm), la actividad anticomplementaria es inferior a 1 CH50 / mg proteína, una estructura molecular íntegra con fragmento Fc superior al 100%, y una distribución fisiológica de subclases de IgG.

19. Método para la producción de gammaglobulina G humana inactivada de virus, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el producto final envasado pasa una cuarentena mínima de 15 días a 25°C, mostrándose la solución translúcida y aparentemente exenta de partículas visibles, siendo estable tanto a la temperatura de conservación de 2°C-8°C como hasta 25°C.

20. Gammaglobulina G humana inactivada de virus, fabricada de acuerdo con el procedimiento de las anteriores reivindicaciones 1 a 19.

Barcelona, 17 ENE. 2001
P.A. de GRUPO GRIFOLS, S.A.



